

Dt69

RIJKSUNIVERSITEIT TE GENT
FACULTEIT VAN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN
LABORATORIUM VOOR DIERKUNDE

**HISTOLOGISCHE STUDIE VAN HET ENDOCRIEN SYSTEEM
EN DE NEUROSEKRETORISCHE CELLEN BIJ DE
KOOLVLIEG (DELIA BRASSICAE BOUCHE)**

door

Danny Degheele

Proefschrift tot het verkrijgen van de graad van
Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen

op gezag van

Rector Prof. Ir. D. Vandepitte

Deken Prof. Ir. M. Slaats

Promotor Prof. Dr. Ir. A. Gillard

Akademisch Jaar 1971-1972

GENT Rijksuniversiteit
Faculteit Landbouwwetenschappen
Centrale Bibliotheek

De bijgevoegde stelling luidt:

"De voorwaarden waaraan volgens Knipling (1955) moet voldaan worden om, door middel van steriele mannetjes-insekten te bestrijden, zijn vatbaar voor vereenvoudiging".

VOORWOORD

Mijn promotor, Professor Dr. A. Gillard, dank ik ten zéerste voor het in mij gestelde vertrouwen en voor zijn voortdurende belangstelling in mijn werk.

Professor Dr. C. Pelerents wil ik danken voor de raadgevingen en de nuttige wenken tijdens mijn werk en voor het kritisch lezen van de tekst.

Professor Dr. L. De Coninck en Professor Dr. K. Dierickx, leden van de jury, ben ik dankbaar voor het lezen en beoordelen van het werk.

Dr. A. De Loof ben ik ten zéerste dankbaar voor het nauwkeurig en kritisch volgen van mijn onderzoek en voor het aanleren van de elektronenmikroskopische technieken. Zijn nieuwe ideeën en zijn vele suggesties bij het samenstellen van de figuren zijn van zeer groot nut geweest.

Professor Dr. J. de Wilde wil ik graag danken voor de mij geboden faciliteiten tijdens mijn verblijf aan het Entomologisch Laboratorium te Wageningen. In het bijzonder houd ik er aan drs. W. Companjen te vermelden die een belangrijk aandeel heeft gehad in mijn histologische scholing over insektenweefsels. Dr. H. Schooneveld van hetzelfde Laboratorium ben ik zeer erkentelijk voor zijn waardevolle raadgevingen over de histologische kleuringen van neurosekretorische cellen bij insekten.

Verder wil ik nog een bijzonder woord van dank sturen aan mijn kollega's L. Hertveldt en E. Delcour. Hun ruime ervaring met de kweek van koolvliegen heeft mijn keuze van het proefinsekt bepaald.

Professor A. Lagasse, Dr. M. Demedts, ing. W. Bohijn, de heren G. Maes en A. Bielen van het Laboratorium voor Elektronenmikroskopie van de RUG dank ik voor het uitvoeren van het elektronenmikroskopisch werk.

Dr. O. Van Laere van het Rijksstation voor Nematologie en Entomologie te Wetteren, Dr. H. Teuchy van het Laboratorium voor Histologie en Lic. A. Druyts van het Laboratorium voor Embryologie en kollega Dr. A. De Grisse dank ik voor hun suggesties om bepaalde problemen bij het elektronenmikroskopisch onderzoek op te lossen.

Vervolgens dank ik mijn kollega's en leden van het technisch en administratief personeel van het Laboratorium voor Dierkunde en van de verschillende I.W.O.N.L. - centra voor de aangename werksfeer en de onderlinge samenwerking. Een bijzonder woord van dank wil ik richten aan ing. G. Buysse van het Centrum voor Genetische Bestrijding, die mij steeds proefinsekten ter beschikking heeft gesteld en aan Mejuffrouw M. Matthys van het Centrum voor Hormonale Bestrijding, voor de betrouwbare uitvoering bij het maken van histologische preparaten.

Tenslotte dank ik Mejuffrouw M. Verstraete voor het typografisch werk, de heer A. Dujardin voor het maken van de clichés en de heren H. Van Bost en A. Merchie voor het offsetwerk.

Gent, 16 mei 1972.

I N H O U D S T A F E L

HOOFDSTUK I. Inleiding en Probleemstelling	1
HOOFDSTUK II. Materiaal en Methoden.	3
2.1. Kweek van het proefinsekt, <u>Delia brassicae</u>	3
2.1.1. Kweekkooi, voeding en eileg der vliegen	3
2.1.2. Kweek en voeding der larven	4
2.1.3. Bewaren van poppen en ontluiken der vliegen	5
2.1.4. Bepalen van de fysiologische leeftijd van de koolvlieg.	6
2.2. Methoden gebruikt voor het histologisch onderzoek	7
2.2.1. Fixatie	8
2.2.2. Dissectie en inbedding.	9
2.2.3. Snijden en monteren op draagglaasjes.	9
2.2.4. Kleuring.	10
a. Paraldehyd-fuchsine kleuring	10
b. Chroom-hematoxyline - phloxine kleuring	11
c. Alcian-blauwkleuring	11
d. Fluorescentie.	12
2.2.5. Het "in situ,, aantonen van het neuro-endocrien systeem.	13
2.2.6. Foto's.	13
2.3. Methoden gebruikt voor het elektronenmikroskopisch onder- zoek.	14
2.3.1. Fixatie	14
2.3.2. Ontwateren.	15
2.3.3. Inbedding	15
2.3.4. Snijden en op draagroostertjes brengen.	16
2.3.5. Kleuring.	17
a. Kleuring met kaliumpermanganaat volgens Robertson & al. (1963)	17
b. Kleuring met loodcitraat volgens Reynolds (1963)	17
2.3.6. Karakteriseren van neurosekreet met elektronenmikroskopi- sche methoden	17
2.3.6.1. Pronase behandeling	18
2.3.6.2. Thiosemicarbazide-zilverproteïnaat reactie.	18

2.3.7.	Foto's	18
2.4.	Methoden gebruikt voor het onderzoek met de rasterelektronenmikroskoop	19
HOOFDSTUK III. De neuro-endocriene regulatie bij insekten		20
3.1.	Inleiding.	20
3.2.	De endocriene organen.	20
	a. Neurosekretorische cellen (NSC) van de hersenen	20
	b. Neurosekretorische cellen (NSC) van de ventrale ganglia	22
	c. Corpora cardiaca (CC)	23
	d. Corpora allata (CA)	24
	e. Prothoracale klieren.	25
3.3.	De neuro-endocriene regulatie.	25
HOOFDSTUK IV. Morfologie van het neurosekretorisch systeem.		28
	A. Algemeen.	28
	B. <i>Delia brassicae</i>	29
HOOFSTUK V. Histologie van de neurosekretorische cellen van de hersenen.		31
5.1.	Inleiding.	31
5.1.1.	Definitie NSC.	31
5.1.2.	Terminologie	31
5.2.	Paraldehyd-fuchsine kleuring van de verschillende typen NSC.	33
5.2.1.	PAF-kleuring van de MNSC	33
5.2.1.1.	Typen NSC in het pars intercerebralis bij de koolvlieg	33
5.2.1.2.	Aantal NSC in het pars intercerebralis bij de koolvlieg.	34
5.2.1.3.	Aantal NSC in het pars intercerebralis bij andere insekten.	35
5.2.2.	PAF-kleuring van de laterale cellen.	36
5.2.2.1.	Literatuurgegevens	36
5.2.2.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	37
5.2.3.	PAF-kleuring van NSC aan de lobus opticus in het popstadium	37
5.2.3.1.	Literatuurgegevens	37

5.2.3.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	38
5.2.4.	PAF-kleuring van NSC in het suboesofageaal ganglion. .	38
5.2.4.1.	Literatuurgegevens	38
5.2.4.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	38
5.3.	Chroom-hematoxyline-phloxine kleuring.	38
5.4.	Alcian-blauwkleuring	39
5.4.1.	Literatuurgegevens	39
5.4.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	39
5.5.	Fluorescentie.	39
5.5.1.	Literatuurgegevens	39
5.5.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	40
5.6.	Samenvatting	40

HOOFDSTUK VI. Elektronenmikroskopisch onderzoek van de MNSC van de hersenen bij de koolvlieg. 42

6.1.	Literatuurgegevens	42
6.2.	Onderzoek bij de koolvlieg	45
6.2.1.	De A-cellen.	45
6.2.2.	De A ₁ -cellen	47
6.2.3.	De B-cellen.	47
6.2.4.	Het Golgi-systeem.	48
6.2.5.	Karakterisatie van de neurosekretorische granula van A en A ₁ cellen	48
6.2.5.1.	Pronase-behandeling.	48
6.2.5.2.	Thiosemicarbazide-zilverproteïnaat reactie	49
6.3.	Samenvatting	49

DISKUSSIE 51

LITERATUUROPGAVE. 57

HOOFDSTUK I

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Bij het gebruik van scheikundige bestrijdingsmiddelen voor het verdelgen van schadelijke insekten oppert men talrijke bezwaren zoals het optreden van resistentie, de giftigheid voor de mens, de toenemende verontreiniging van de ecosfeer, het optreden van secundaire plagen en de schadelijke nevenwerking op roofvijanden en natuurlijke parasieten. In de geïntegreerde bestrijding tracht men een oplossing te vinden door naar nieuwe methoden te zoeken waardoor deze nadelen toch gedeeltelijk weggewerkt worden.

Een van deze methoden is de fysiologische bestrijding hetzij met hormonen, hetzij met feromonen. Uit de huidige stand van de onderzoeken blijkt dat insektenhormonen of analoge produkten reeds als bestrijdingsmiddel in aanmerking kunnen komen. Hierdoor zullen de thans gebruikte insecticiden gedeeltelijk kunnen vervangen worden. Het gebruik van feromonen en hormonen als bestrijdingsprocédé vereist een grondige studie van de insektenfysiologie. Een juist inzicht in de werkingwijze van hormonen vereist een zeer goed inzicht in het mechanisme van de neuro-endocriene regulatie. Daarvoor is een grondige histologische en cytologische studie van de centra der neuro-endocriene regulatie gewenst. Het voornaamste centrum van deze neuro-endocriene regulatie is in de hersenen gelegen. Het bestaat uit een aantal neurosekretorische cellen die een kompleks geheel uitmaken.

Het doel van deze studie was een beeld te verkrijgen over de bouw en de ligging van het centrum als inleiding tot verdere onderzoeken over het voorkomen, de aard en de functie van hormonen in de hersenen.

Om de neurosekretorische cellen (NSC) te situeren werd eerst een morfologische studie van het neuro-endocrien systeem uitgevoerd. Met behulp van histologische kleuringsmethoden werd ligging, type en aantal NSC bepaald. Het was echter onmogelijk om een grondige studie over de bouw van de NSC met deze methoden te maken. Hiervoor werden

elektronenmikroskopische technieken toegepast. Om de aard van de neurosekretorische granula, die het voornaamste kenmerk van een NSC zijn, te bepalen werd gebruik gemaakt van histochemische en enzymatische reacties.

Als proefobject werd de koolvlieg (Delia brassicae Bouché) gekozen, omdat deze economisch belangrijke plantenbeschadiger reeds verschillende jaren in het Laboratorium voor Dierkunde bestudeerd wordt met het doel andere bestrijdingsmethodes op punt te stellen dan de scheikundige.

HOOFDSTUK II

MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Kweek van het proefinsekt, *Delia brassicae*

De koolvlieg, *Delia brassicae* behoort tot de orde der Diptera en tot de familie der Anthomyidae (fig. 1). Ze behoort verder tot de cyclorafe Diptera (bezit lunula, fig. 2). De vlieg is een belangrijke beschadiger van koolgewassen en voederrapen.

In het laboratorium kunnen deze vliegen in grote aantallen gekweekt worden. De kweekmethode is als volgt :

2.1.1. Kweekkooi, voeding en eileg der vliegen

De koolvliegen worden gehouden in kweekkooien van 56 x 56 x 50 cm (fig. 3). Proefinsekten worden in huishouddozen van 10 x 10 x 16 cm gehouden (fig. 4). De vier cellofaanwanden van de grote kweekkooien laten voldoende licht binnendringen, terwijl de nylon bovenzijde van de kooi een goede verluchting toelaat. Op de bodem van de kooi ligt een dikke laag vochtig gehouden schuimrubber.

De relatieve vochtigheid in de kooi bedraagt ongeveer 70 %, terwijl de temperatuur er dezelfde is als in het laboratorium (gemiddeld 20° C).

De vliegen kunnen water zuigen aan vochtig filtreerpapier dat gespannen is over een met water gevulde omgekeerde beker. De vloeibare voeding bevat volgende bestanddelen :

- 4 delen brouwersgist
- 6 delen saccharose
- 10 delen leidingswater

Men voegt hieraan enkele druppels NaOH N/10 toe om een pH = 7 te bekomen.

Blokjes koolraap of rutabaga, *Brassica napus napobrassica* (L) Rchb., van 1,5 x 1 x 1 cm worden gebruikt als ovipositie-stimulans en -substraat. Deze worden op filtreerpapier, Ederol Nr. 261, op een glazen plaat gelegd. De eitjes worden gedeponneerd

tussen het filtreerpapier en de rand van het blokje. Dagelijks worden de eitjes met een penseeltje in een petrischaal verzameld. Hierin worden zij gedurende twee dagen bewaard in een dessicator waarin een weinig water is aangebracht. Op deze wijze verkrijgt men een voldoende hoge vochtigheid, noodzakelijk voor de ontwikkeling van het embryo.

2.1.2. Kweek en voeding der larven

Als voedingsmedium voor de larven wordt eveneens koolraap gebruikt. Deze wordt eind oktober op het veld geoogst en zorgvuldig ontkopt. De koolraap wordt dan in een koelkast bij 4° C gestockeerd wat toelaat gedurende negen à tien maanden over voldoende voedsel voor de larven te beschikken. Gedurende de overige twee à drie maanden worden koolrapen gebruikt die rechtstreeks van het veld komen.

De koolrapen worden in 4 cm dikke schijven gesneden en gespoeld in een 2 ‰ chlooramine - T - oplossing (na een langdurige bewaartijd kan rotting optreden). Aan de bovenzijde worden groefjes gesneden. Dan worden de eitjes uit de dessicator genomen en gelijkmatig over de schijven uitgestrooid. Ongeveer 1 eitje per 1 à 1,3 gram koolraap geeft een optimale benutting van het voedsel door de larven en bovendien een hoog aantal grote poppen. De pas ontloken larfjes vreten zich gemakkelijk in de koolraap via de gemaakte groefjes. Een laagje licht vochtig zand op de rutabagaschijf verhindert én uitdrogen van de larven én verharden van de rutabaga. De schijven worden dan in koelkastdozen (21 x 15 x 5 cm) op een laag zand gelegd. Al het gebruikte zand is een 1 mm fraktie Rijnzand dat gedurende 1 nacht op 140° C werd gesteriliseerd.

De koelkastdozen worden gedurende twee à drie dagen gesloten gehouden tot de jonge larven zich voldoende ingevreten hebben. Daarna wordt de doos geopend omdat een te hoge vochtigheid schimmelvorming en rotting bevordert. Indien nodig kan, zonder schade voor de larven, het zand met Brassicol (fungicide) bepoederd worden.

Na tien dagen keert men de schijven rutabaga om. Dit zou het uitvreten bevorderen waardoor de larven, volwassen na ongeveer drie weken, gemakkelijk uit het stuk koolraap kunnen kruipen om te gaan verpoppen in het zand. Wanneer dit gebeurd is neemt men de uitgevreten rutabaga weg en laat de doos nog twee à drie dagen open staan. Al de larven zijn nu verpopt in het zand. Op een zeef (maaswijdte 2 mm) worden de poppen en het zand gescheiden met lauw water.

De poppen blijven nog 1 dag op de zeef drogen en worden dan in kleine containers verzameld.

2.1.3. Bewaren van poppen en ontluiken der vliegen

De containers zijn samengesteld uit twee perspexringen met een diameter van 90 mm en een respektievelijke hoogte van 30 mm en 5 mm. De kleinste ring dient als deksel en wordt vastgehouden door vier staafjes die aan de buitenzijde van de grote ring zijn gekleefd. Bovenaan en onderaan is deze container afgesloten met nylongaasdoek. Dit systeem geeft een voldoende ventilatie en vergemakkelijkt een regelmatige controle van de poppen.

Van de 14^{de} tot de 19^{de} dag na de verpopping ontluiken ongeveer 60 procent der vliegen. Gedurende de eerste drie dagen van deze periode bestaan de ontloken vliegen voor 80 procent uit mannetjes. Een tweede ontluikingsperiode ligt tussen de 32^{ste} en de 43^{ste} dag na de verpopping. Ongeveer 30 procent der vliegen ontluikt gedurende deze periode. Om reden van uniformiteit werden alleen wijfjes uit deze tweede periode genomen. Gedurende een derde ontluikingsperiode, gelegen tussen de 55^{ste} en 60^{ste} dag ontluiken nog eens ongeveer 5 procent der vliegen. De rest der poppen is afgestorven of zal slechts in de loop der 4 volgende maanden ontluiken.

Deze ontluikingsperiodes zijn meer gedetailleerd beschreven in een niet gepubliceerd verslag (1970) over de werkzaamheden van het comité voor de toepassing van isotopen in het landbouwonderzoek (I.W.O.N.L.).

De kweektechniek in het laboratorium is in extenso beschreven door Vereecke & Hertveldt (1971) en Zohren (1968).

2.1.4. Bepaling van de fysiologische leeftijd van de koolvlieg

Men heeft vastgesteld dat over een tijdsspanne van 24 uur, 80 procent der vliegen in de vroege morgen ontluiken. De vliegen die in de loop van de dag uitkomen worden 's avonds verwijderd. Bijgevolg kunnen de vliegen die men 's morgens verzameld maximum 14 uur vroeger ontpopt zijn.

Men kan de wijfjes van de mannetjes onderscheiden aan volgende kenmerken : de wijfjes hebben een scherp uitlopend abdomen (legboor !); de komplexogen raken elkaar niet op de kop ; de cuticula is meer bruin gekleurd.

Vóór het seksen worden de vliegen gedurende 30 sec. verdoofd met CO_2 .

De gemiddelde levensduur van de wijfjes en van de mannetjes bedraagt respektievelijk 13 en 12 dagen. De maximale levensduur bedraagt respektievelijk 32 en 23 dagen. Beide geslachten zijn na 3 - 4 dagen geslachtsrijp.

Om zeker te zijn dat de gebruikte koolvliegen (wijfjes) dezelfde fysiologische leeftijd en ontwikkeling hadden werd de ovariumontwikkeling van iedere koolvlieg afzonderlijk gecontroleerd. De ovaria zijn van het polytroof type. Elk ovarium telt ongeveer 25 ovariolen (minimum 19, maximum 31) (eigen onderzoek, Moens 1972). De terminale oöcyt in elk van deze ovariolen ontwikkelt synchroon, zoals dit bij de meeste insekten het geval is. Men kan de ontwikkelingsgraad van de terminale oöcyt als maatstaf voor de fysiologische leeftijd nemen. Deze parameter kan men echter maar gebruiken tot op het ogenblik dat de vlieg voor de eerste keer eitjes gaat leggen. Highnam (1961 ; 1962), Mordue (1965 a, b) en Lea (1967) hebben de lengte van de terminale oöcyt gemeten.

Om veelvuldig en tijdrovend meten te vermijden werd de ontwikkeling van de terminale oöcyt vergeleken met de 14 ontwikkelingsstadia van de oögenese, door Jobsen (1966) beschreven voor Musca domestica. Deze auteur beschreef steunend op vorm en lengte van de terminale oöcyt 14 S - stadia ($S_1 - S_{14}$). Bij de koolvlieg zijn deze 14 stadia terug te vinden. De ontwikkelingsstadia van de ovariolen bij de koolvliegen op de 4 hieron-

der beschreven tijdstippen zijn weergegeven in fig. 5.

- in poppen, een paar dagen vóór het ontluiken, bevindt de oögenese zich reeds in het $S_3 - S_4$ of S_5 stadium : rond de eikamer is reeds een laag kubische of cilindrische follikelcellen te zien.
- bij wijfjes van 0 tot 3 uur oud is de oögenese gevorderd tot het $S_6 - S_7$ stadium : de min of meer ronde eikamer begint ellipsoïdaal te worden ; er is een begin van dooievorming en de oöcyt heeft ongeveer dezelfde grootte als een trofocyt.
- bij wijfjes van 2 tot 3 dagen oud vult de oöcyt $1/4$ tot $3/4$ van het volume van de eikamer : dit komt overeen met het $S_9 - S_{10}$ stadium.
- bij wijfjes van 6 tot 7 dagen oud zijn de terminale oöcyten volledig of bijna volledig ontwikkeld : de oögenese is gevorderd tot het $S_{12} - S_{14}$ stadium ; de terminale oöcyt heeft zijn maximale afmetingen bereikt.

2.2. Methoden gebruikt voor het histologisch onderzoek

Voor het histologisch onderzoek werden vliegen of poppen gebruikt waarvan de fysiologische leeftijd bepaald werd zoals in 2, 1, 4 beschreven. Het resultaat van histologische technieken wordt op gekleurde coupes van het weefsel afgelezen. Om kleuringsmethoden te kunnen gebruiken moet het te onderzoeken weefsel eerst gefixeerd worden. Dat wordt uitgevoerd met de bedoeling autolyse in het weefsel tegen te gaan, de inwerking van micro-organismen te verhinderen, de eiwitstructuren vast te leggen en de brekingsindex van de structuren te veranderen. Om het weefsel te kunnen snijden wordt het gehard en ingebed in paraplast. De coupes worden op draagglaasjes gekleefd en gekleurd. De kleurstoffen zijn zodanig gekozen dat de volledige coupe selektief gekleurd wordt en dat de NSC een typische kleuring gaan ondergaan waardoor ze van de overige cellen en onderling kunnen onderscheiden worden. Op de onderlinge verschillen in kleurreactie is de typering gesteund.

Om de aard van het cytoplasma te bepalen wordt een Alcianblauw en een fluorescentie kleuring toegepast. De fluorescentie

kleuring wordt ook gebruikt om uiterst kleine hoeveelheden neurosekretorische granula aan te duiden.

Om de neurosekretorische cellen in situ aan te tonen wordt een methode gebruikt waarvoor men het gefixeerde weefsel niet meer moet inbedden en snijden.

2.2.1. Fixatie

Na 30 seconden verdoving in een CO_2 - atmosfeer worden koolvliegen even in een verdunde zeepoplossing ondergedompeld en dan in het fixatiemiddel gebracht. Het flesje met fixatief en de te fixeren vliegen wordt in een dessicator gebracht, waarin met behulp van een waterstraalpomp vacuum van ongeveer 70 cm Hg gezogen wordt. Na een paar minuten laat men de dessicator terug vollopen met lucht. Vervolgens herhaalt men eens de procedure. Het eerste fixatief wordt dan weggezogen en vervangen door vers fixatiemiddel. De fixatie gebeurt bij kamertemperatuur en duurt ongeveer 24 uur. Door de zeepoplossing verliest de cuticula haar waterafstotende eigenschappen. Dit heeft voor gevolg dat de cuticula nu volledig door het fixatief zal bevochtigd worden, hetgeen absoluut vereist is voor een goede fixatie.

Susa werd gebruikt als fixatief, dit bestaat uit 70 ml S_1 , 10 ml S_2 , 20 ml formol en 4 ml ijsazijn. De componenten worden samengevoegd juist vóór de fixatie. S_1 en S_2 zijn stockoplossingen die als volgt samengesteld zijn : S_1 : 45 g sublimaat (HgCL_2) en 5 g NaCL opgelost in 700 ml aq. dest. en S_2 : 20 g trichloorazijnzuur opgelost in 100 ml aq. dest.

Susa gaf de beste resultaten met betrekking tot de duidelijkheid van de kleurreactie met paraldehyd-fuchsine en met betrekking tot de beste preservatie van de structuur van het zenuwweefsel en de hersenen. Andere geteste fixatiemiddelen zoals Bouin, gewijzigde Bouin (Gomori 1939-1941), Helly en Carnoy gaven minder goede resultaten bij de koolvlieg.

Volgens Schreiner (1966) moeten de alcoholhoudende fixatiemiddelen vermeden worden, niet omdat het neurosekretorisch materiaal oplosbaar is in alcohol, maar omdat alcohol het kleur-

baar gedeelte van het neurosekretorisch materiaal oplosbaar maakt in water.

2.2.2. Dissektie en inbedding

Na 1 dag fixatie wordt Susa uitgespoeld met ethanol 90 %. In deze ethanol wordt de dissektie uitgevoerd. Om het hersenweefsel te bestuderen wordt de kop van het lichaam gescheiden, de zuigsnavel samen met de meeste gechitiniseerde delen verwijderd; vervolgens worden de luchtzakken rond het hersenweefsel zoveel mogelijk weg of opengetrokken. Deze behandelingen zijn nodig om een goed contact tussen paraplast en het hersenweefsel mogelijk te maken en om te verhinderen dat stukjes van de cuticula aan het mes zouden kleven hetgeen krassen veroorzaakt. Wil men ook het gedeelte van het endocrien systeem in de thorax gelegen bestuderen, dan verwijdert men het achterlijf, de poten, de vleugels en de vliegspieren van de thorax.

Via ethanol 96 % en methylbenzooat (2 x) wordt het weefsel naar celloïdine (2 %), opgelost in methylbenzooat, overgebracht waarin het gedurende drie dagen blijft liggen. Vervolgens verblijft het weefsel gedurende 3 maal 10 minuten in benzeen om methylbenzooat te verdringen. Hierna komt het weefsel in paraplast bij 60° C voor 3 maal 10 minuten om benzeen te verdringen en uiteindelijk wordt het weefsel dan in paraplast ingebed.

2.2.3. Snijden en monteren op draagglaasjes

Het snijden gebeurde met een Leitz microtoom (Minot - Mikrotom Typ 1212). Als mes gebruikten we het C - type van Leitz. Voor het routine - onderzoek werd "frontaal," gesneden op een dikte van 5 μ . Voor anatomische studies werd ook op een dikte van 7 μ en in "dwarse," en "sagittale," richting gesneden.

De draagglaasjes werden gedurende enkele dagen ontvet in een waterige oplossing van 5 % 7 X - zeep (Serva-Heidelberg), daarna gespoeld met leidingswater en aq. dest. en gestockeerd in ethanol 96 %.

De lintjes werden op draagglaasjes gekleefd met een oplossing van aceton (2 ml), methylbenzooat (1 dr.), aqua dest. (8 ml) en eventueel 1 dr. eiwitglycerine (Romeis, 1968). Na het strekken op een verwarmplaat bij 40° C werd de overtollige kleefstof verwijderd en de lintjes met filtreerpapier aangedrukt. Het nadrogen gebeurde in een broedstoof bij 42° C gedurende één nacht.

2.2.4. Kleuring

- verwijderen van paraplast : 2 x 5 minuten in xylol
- afvoeren naar aq. dest. via ethanol 96 % (2x) 90 %, 70 % en 50 %.

2.2.4. a) Paraldehyd-fuchsine_kleuring_(PAF)

Deze methode werd voor het eerst gebruikt door Gomori (1950). De bereiding van de kleurstof werd in 1953 door Gabe gewijzigd. De gewijzigde methode van Cameron en Steele (1959) met een tegenkleuring volgens Halmi (1952) werd door ons toegepast.

- oxydatie in Gomori's fluid (1941) gedurende 1 min. (0,15 g KMnO_4 opgelost in 50 ml aq. dest. + 0,1 ml H_2SO_4 95 - 98 %)
- ontkleuren in een waterige oplossing van 2,5 % natriumbisulfiet tot de bruine kleur volledig verdwenen is (enkele seconden)
- 5 min. spoelen in leidingswater
- aq. dest.
- ethanol 50 %, ethanol 70 %
- gedurende 10 min. kleuren in paraldehyd-fuchsine (0,25 g kleurstof opgelost in 50 ml ethanol 70 %)
- achterkant van draagglas vlug afvegen en in ethanol 96 % spoelen
- tweede maal in ethanol 96 % spoelen tot geen kleurstof meer vrijkomt
- afvoeren naar aq. dest. via ethanol 70 % en 50 %
- tegenkleuren volgens Halmi (1952) :
 - gedurende 30 sec. in een oplossing van

0,2 g light green
 1 g orange G. in 100 ml
 0,5 g chromotroop 2 R.
 0,5 g fosfotungsteen zuur aq. dest.
 1 ml ijsazijn

- gedurende 30 sec. in zelfde oplossing waarin 0,2 g light green vervangen was door 0,8 g light green.
- vlug spoelen in ethanol 96 % waarin een waterige oplossing van 0,2 % azijnzuur
- nog 2 maal spoelen in ethanol 96 %
- absolute ethanol of tertiaire butylalkohol
- 3 maal xylol en afdekken met DPX.

2.2.4. b) Chroom-hematoxyline-phloxine-kleuring (CHP)

De kleuring werd uitgevoerd volgens de oorspronkelijke methode door Gomori in 1941 beschreven. Hierbij werd rekening gehouden met de beschrijving van deze methode door Gabe in 1966. We zullen hier geen gedetailleerde opgave geven van de verschillende uit te voeren bewerkingen omdat we, ondanks herhaalde pogingen, nooit een blauwkleuring (door de hematoxyline) van het neurosekreet bekomen hebben. Bovendien het fixatiemiddel van Gomori (1941) nl. de gewijzigde Bouin hebben we ook Susa gebruikt, maar hiermee kregen we evenmin resultaat.

Gewijzigde Bouin (Gomori 1939-1941) :

- 80 ml picrinezuur verzadigde oplossing in aq. dest.
- 20 ml formol
- 2,5 ml ijsazijn
- 2,5 g sulfosalicylzuur.

2.2.4. c) Alcian-blauwkleuring

De fixaties voor deze kleuring worden uitgevoerd met formol 4 % in fosfaatbuffer bij pH : 7 (Lillie 1954).

Samenstelling :

- 100 ml formol (40 % formaldehyde)
- 900 ml aq. dest.
- 4,7 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 7,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Werkwijze : (Lev & Spicer 1964)

- oxydatie : id. PAF
- ontkleuren : id. PAF
- leidingswater
- aq. dest.
- ofwel Alcian blauwkleuring 1 % opgelost in azijnzuur 3 % (pH : 2,5)
- ofwel Alcian blauwkleuring 1 % opgelost in 0,1 N. HCL (pH : 1)
- ofwel Alcian blauwkleuring 1 % opgelost in 0,5 N. HCL (pH : 0,5)
- draagglas eerst afdrogen met filtreerpapier om te verhinderen dat de pH stijgt
- deshydrateren en afdekken.

2.2.4. d) Fluorescentie

De methode van Sterba (1961,b) en deze van Coalson (1966) werden toegepast. Deze van Sterba gaf de beste resultaten bij de koolvlieg.

De fixatie gebeurde met Susa en de coupes werden op 4 μ gesneden.

De fluorescentie werd op de volgende manier verkregen:

- oxydatie gedurende 2 min. in een waterige oplossing van 2,5 % KMnO_4 (1 d.), H_2SO_4 5 % (1 d.) en 8 d. aq. dest. (vers gemaakte oplossing 15 min. laten rijpen)
- ontkleuren in een waterige oplossing van 1,5 % natriumsulfiet gedurende 10-30 sec.
- gedurende 5 min. wassen in leidingswater
- aq. dest.
- 2 min. in oplossing van N,N' - diethylpseudoisocyaninchloride (14,5 mg opgelost in 100 ml aq. dest.)
- wassen in leidingswater
- wassen in ammoniakwater (2 druppels NH_4OH in 100 ml aq. dest.). Deze zwak alkalische reactie vertraagt de depolymerisatie in U.V. licht aanzienlijk.
- de coupes kunnen hierna rechtstreeks of na een verblijf van 30 - 40 min. in ammoniakwater afgedekt worden.

De coupes worden best zo vlug mogelijk met de fluorescentiemikroskoop onderzocht omdat de fluorescentie een onstabiele toestand is die vlug vermindert met de tijd.

Om zo weinig mogelijk lichtstralen te verliezen werden de coupes afgedekt met een saccharose-oplossing met dezelfde brekingsindex als glas.

De M_{20} mikroskoop van Wild werd gebruikt in combinatie met een hogedruk-kwikdamplamp Osram "HgHBO 200" om de fluorescentie waar te nemen. De volledige opstelling van de mikroskoop met de nodige toebehoorten werd door Van Laere (1969) beschreven.

2.2.5. Het "in situ" aantonen van het neuro-endocrien systeem.

De kleuringsprocedure II van Dogra & Tandan (1964) werd hiervoor gevolgd. Deze bestaat uit een aangepaste procedure van de PAF-kleuring volgens Cameron & Steele (1959) voor de in situ kleuring. Deze werd nog op haar beurt gewijzigd voor de kleuring van het hersenweefsel van de koolvlieg.

Werkwijze:

- fixatie met Susa gedurende 12 à 24 uur
- uitspoelen van Susa met ethanol 70%
- afvoeren naar aq. dest.
- vanaf de oxydatie tot en met een tweede maal spoelen in ethanol 96% na de kleuring is de te volgen procedure deze beschreven in 2, 4, d.
- in geval er nog te veel kleurstof op het hersenweefsel voorkomt differentiëren in ethanol 70%
- opvoeren naar ethanol 96%
- opklaren in cederhoutolie gedurende 2 tot 4 uur (dit kan ook overnacht gebeuren)
- 2 maal in xylol gedurende 10 min.
- afdekken met Canada-balsem.

2.2.6. Foto's

De opnamen werden gemaakt op 35 mm film Agfapan 100 (21 Din). Hiervoor werd een "Wild Microphotoautomate" gebruikt op de M_{20} Wild-mikroskoop. De foto's werden afgedrukt op wit

glanzend Brovira papier van Agfa-Gevaert.

2.3. Methoden gebruikt voor het elektronenmikroskopisch onderzoek

Vermits histologische methoden geen informatie genoeg gaven over de bouw van de NSC werden elektronenmikroskopische methoden toegepast op koolvliegen met dezelfde fysiologische ontwikkeling als deze met histologische methoden behandeld. De fixatiemethoden, de inbedding, het snijden en de kleuring worden achtereenvolgens besproken. De karakterisatie van het neurosekreet wordt gedaan met een enzymatische en een histochemische reactie.

2.3.1. Fixatie

De fixatie gebeurde in glutaraaldehyde 2,5 % in 0,1 M fosfaatbuffer met pH : 7,2 gedurende 2 uur in smeltend ijs. De fosfaatbuffer (Sorenson) werd bekomen door 3,876 g KH_2PO_4 en 12,72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ op te lossen in 0,5 liter aq. dest. (= 0,2 M). De dissektie van het hersencomplex werd vooraf in ijskoude glutaraaldehyde oplossing uitgevoerd. Vóór het gebruik werd glutaraaldehyde uitgeschud met bariumcarbonaat. Vroeger werd hiervoor aktieve kool gebruikt (Fahimi & Drochmans, 1965), maar dit bracht nogal bezwaren mee voor de uitvoering. Deze behandeling werd uitgevoerd om de absorptiepiek bij 230 m μ zoveel mogelijk te verwijderen (om afbraakprodukten die een schadelijke invloed op de fixatie hebben te verwijderen).

Men verwijderde de glutaraaldehyde uit het weefsel door enkele malen te spoelen met 0,1 M fosfaatbuffer (pH : 7,2) die 6,16 % sucrose bevatte. De minimum duur van spoelen was 1 uur. In onze experimenten duurde het uitwassen van het fixatief altijd minstens 1 nacht.

Hierna werd een tweede fixatie met OsO_4 1 % uitgevoerd (0,1 g OsO_4 werd opgelost in 5 cc fosfaatbuffer (0,2 M) en 5 cc aq. dest. ten minste 24 uur vóór gebruik). Deze fixatie werd eveneens in smeltend ijs uitgevoerd.

Volgens Hayat (1970) is het aan te raden een dubbele fixatie met glutaraaldehyde en osmiumtetroxide te gebruiken om een maximum aantal verschillende typen van moleculen te fixeren.

Door deze dubbele fixatie is het verlies aan celbestanddelen het kleinst.

2.3.2. Ontwateren

Het ontwateren gebeurt door het weefsel, na de postfixatie in $O_S O_4$, over te brengen in ethanol 30-50-70-90-96 %, telkens gedurende 10 min.; vervolgens gedurende 15 min. in absolute ethanol en ten slotte gedurende 2 maal 15 min. in propyleenoxide.

2.3.3. Inbedding

Hiervoor werd ERL verkozen boven Epon. ERL is een epoxy-hars met lage viscositeit waardoor het zeer gemakkelijk te hanteren was. Het standaardmengsel volgens Spurr (1969) bestaat uit :

- ERL - 4206 (vinyl cyclohexeen dioxide) : 10 g
- D.E.R. 736 (diglycidyl ether van polypropyleen glycol) : 6 g
- NSA (nonenyl barnsteen-zuur-anhydride) : 26 g
- S-1 (dimethylamino-ethanol van DMAE) : 0,4 g.

ERL schijnt in het weefsel niet zo goed binnen te dringen als Epon, maar voor het hersenweefsel scheen dit helemaal geen bezwaar te zijn. Weefsels ingebed in ERL kleuren niet zo kontrastrijk. Om hieraan te verhelpen werd de dubbele kleuring (uranylacetaat ; Watson, 1958 - loodcitraat ; Reynolds, 1963) vervangen door de dubbele kleuring (kaliumpermanganaat ; Robertson & al, 1963 - loodcitraat). Het grote voordeel van ERL boven Epon is zijn goede snijbaarheid. Alleen om deze reden werd ERL voor ons onderzoek verkozen. Het vinden van de weinige NSC tussen de honderden cellen van het hersenweefsel ging des te gemakkelijker naarmate de coupe groter was. Hierdoor was er meer mogelijkheid om aan de hand van het omgevend weefsel het "pars intercerebralis" te situeren. Bij het gebruik van Epon waren de afmetingen van de grootste coupes die wij konden maken nog minstens 4 à 5 maal kleiner dan bij ERL inbedding.

Na de propyleenoxide behandeling werd aan 1 volume propyleenoxide (waarin de weefsels aanwezig) 1 volume ERL toegevoegd. Men plaatste de flesjes op een traag draaiende schuin staande

schijf om een gelijkmatige penetratie van ERL te bevorderen. Aan dit mengsel voegde men na ongeveer 1 uur opnieuw 2 vol. ERL toe. Na 1 uur werd het mengsel propyleenoxide - ERL verwijderd en voegde men zuivere ERL aan de weefsels toe. Dit werd dan gedurende een nacht op de draaiende schijf geplaatst. 's Anderdaags werd de ERL nogmaals ververst en gedurende een paar uur gemengd. Hierna werden de hersenweefsels definitief ingebed en gedurende ten minste 8 uur bij een temperatuur van 70° C geplaatst.

2.3.4. Snijden en op draagroostertjes brengen

De coupes werden gemaakt met het ultramikrotoom LKB Ultratoom III. Glazen messen van 25 mm met een snijhoek van 50° werden gebruikt. Deze werden vervaardigd met de LKB Knife Marker Type 7801 B.

De coupes werden op 600 Å dikte gesneden. De dikte wordt onrechtstreeks bepaald aan de hand van de wit-gele interferentiekleur die de coupes vertonen na het strekken. Onder strekken wordt verstaan het verwijderen van plooitjes uit de coupes. We verkregen dit door een propje watten doordrenkt met toluol boven het waterbakje met de coupes te houden.

Het pars intercerebralis gebied met de NSC werd opgezocht door 1 μ coupes te kleuren met toluidineblauw (Pease, 1964).

Werkwijze :

- op draagglas met coupes enkele druppels kleurstof (oplossing van 1 % toluidineblauw in borax 1 % oplossing in aq. dest.) brengen
- verwarmen tot damp opstijgt en de kleurstof begint te borrelen
- wassen in aq. dest.
- opvoeren in ethanol 70 en 96 % en laten opdrogen
- afdekken met DPX.

Volgens Pease schijnt de oplossing van toluidineblauw in borax maar 6 maand houdbaar te zijn. We hebben deze oplossing bijna 2 jaar in gebruik zonder enige achteruitgang in kleuringsmogelijkheid te zien.

Met deze kleuring werden de NSC zeer gemakkelijk gesitueerd zodat men tot het snijden van 600 Å coupes kan overgaan (fig. 6). De coupes werden op draagroostertjes (beter gekend onder de naam van gridjes) van het model H₇, type L 2 x 1 met een diameter van 3 mm gelegd. De opening werd overspannen met een formvar-draagfilm (een oplossing van 0,5 % formvar in chloroform). Na de kleuring der coupes wordt boven- en onderzijde nogmaals met een laagje koolstof bedekt. Men doet dit om de "drift" in de elektronenmikroskoop te verminderen. Het opbrengen van een koolstoflaagje gebeurde in een "Vacuum Evaporator, Type JEE 4B", van Japan Electron Optics.

2.3.5. Kleuring

De coupes worden gekleurd met kaliumpermanganaat, gevolgd door loodcitraat.

2.3.5. a) Kleuring met kaliumpermanganaat volgens Robertson & al. (1963)

- 2 % KMnO₄ gedurende 5 minuten
- zorgvuldig afspoelen met Pal's bleekmiddel om MnO₂ neerslag te verwijderen.

Pal's bleekmiddel wordt gemaakt vóór gebruik (blijft 4 uur bruikbaar) : 3 druppels van de stockoplossingen natrium sulfiet (Na₂SO₃) 1,2 % in water en oxaalzuur 1 % in water in 10 ml aq. dest.

- spoelen met aq. dest.

2.3.5. b) Kleuring met loodcitraat volgens Reynolds (1963)

- gefiltreerd loodcitraat in een petrischaal met NaOH "pellets", om neerslag van loodcarbonaat op het preparaat te voorkomen. Kleuring gedurende 3 minuten
- spoelen met NaOH 0,01 N en aq. dest.

Opmerking : het voor de kleuringen gebruikte aqua dest. werd gefiltreerd.

2.3.6. Karakteriseren van neurosekreet met elektronenmikroskopische methoden

2.3.6.1. Pronase behandeling (Monneron & Bernhard 1966)

Deze behandeling wordt uitgevoerd op coupes die op draagroostertjes liggen en bestemd zijn voor onderzoek met de elektronenmikroskoop.

Werkwijze :

- oxydatie : perjoodzuur 10 % in aq. dest. gedurende 30 min.
- spoelen met aq. dest. pH : 7,4 (pH geregeld met NaOH 0,01 N)
- enzymatische reactie met Pronase (Pronase P, Serva 33634): 0,5 % in aq. dest. (pH : 7,4) gedurende 1 uur bij 40° C
- kleuring : zie 2, 3, 5.

2.3.6.2. Thiosemicarbazide - zilverproteïnaat reactie (Thiery, 1967)

Deze behandeling werd uitgevoerd met drijvende coupes.

Werkwijze :

- perjoodzuur 1 % in aq. dest. gedurende 20 à 30 min.
- spoelen met aq. dest. (2 maal kort + 1 maal 10 min.)
- behandeling met T.S.C. (thiosemicarbazide) 1 % opgelost in waterige oplossing van azijnzuur 10 %, gedurende respectievelijk 30 min., 24 uur, 48 en 72 uur
- spoelen met waterige oplossing van azijnzuur 10 % (2 maal kort + 3 maal 20 min.)
- spoelen met waterige oplossing van azijnzuur 5 %
- spoelen met waterige oplossing van azijnzuur 2 %
- spoelen met waterige oplossing van aq. dest. (2 maal kort + 3 maal 20 min.)
- op draagroostertjes brengen (van bovenaf afnemen !)
- op druppel zilverproteïnaat 1 % in aq. dest. leggen gedurende 30 min. in duisternis
- spoelen met aq. dest.

2.3.7. Foto's

De foto's werden genomen met de Philips EM 300 elektronenmikroskoop. Overzichtsfoto's werden gemaakt met een vergroting van 2.800 en 7.100, detailfoto's met een vergroting van 18.000 of meer.

Voor de opnamen werden 35 mm film (Scientia 22 D 50 van Agfa- Gevaert) en de vlakfilm (Scientia 23 D 56 van Agfa- Gevaert) gebruikt. De foto's werden afgedrukt op wit glanzend Brovira papier van Agfa- Gevaert.

2.4. Methoden gebruikt voor het onderzoek met de rasterelektronen- mikroskoop

Met de rasterelektronenmikroskoop is men in staat heel het oppervlak van een organisme scherp in te stellen en hiervan een ruimtelijk beeld te fotograferen.

De werking en de toepassingsmogelijkheden van de rasterelektronenmikroskoop heeft Nixon in 1969 beschreven.

Hoe dierlijke weefsels of organismen best moeten voorbereid worden hebben Boyde & Wood (1969) beschreven.

Alvorens over te gaan tot de fotografische opnamen werd de koolvlieg na sterke verdoving met CO_2 één nacht bij -20°C bewaard, vervolgens werd zij op een "draagtafeltje" gekleefd alvorens onder hoogvacuum bestoven te worden met goud.

Voorbehandelingen met vloeibare lucht en liofilisatie schakelden geenszins het optreden van depressies uit die soms voorkomen gedurende het verstuiven van goud onder hoogvacuum.

Er werd gewerkt met de "Cambridge Stereoscan Type 96113 - 2 A". De kleinbeeldfilm Ilford Pan F 18 Din werd gebruikt en de foto's werden gemaakt op wit glanzend Brovira papier van Agfa- Gevaert.

HOOFDSTUK III

DE NEURO - ENDOCRIENE REGULATIE BIJ INSEKTEN

3.1. Inleiding

De regulatie van de meeste fysiologische verschijnselen van het insectenleven wordt rechtstreeks of onrechtstreeks bepaald door een neuro-endocrien systeem, waarvan de hersenen als centrum van de neuro-endocriene regulatie beschouwd worden. (B. Sharrer 1959). Dit systeem is opgebouwd uit een gedeelte van het centraal zenuwstelsel en een aantal endocriene klieren. De endocriene organen van het centraal zenuwstelsel worden neurosekretorische cellen genoemd. Dit zijn in feite gewijzigde motorische neuronen die tevens de verbinding vormen met de endocriene klieren. Als endocriene klieren worden aanzien: corpora cardiaca, corpora allata en prothoracale klieren. Zowel de N.S.C. als de endocriene klieren produceren hormonen (door Gabe, 1966; "ergonen" genoemd), die hetzij rechtstreeks, hetzij onrechtstreeks aan het bloed afgegeven worden en dit gebeurt onder invloed van zenuwprikkels.

3.2. De endocriene organen

3.2. a) Neurosekretorische cellen (NSC) van de hersenen

NSC werden door Weyer (1935) voor het eerst beschreven in de hersenen van de honigbij. Hanström (1938) ontdekte ze bij de wants Rhodnius probiscus. Bij deze wants toonde Wigglesworth (1939, 1940) voor het eerst aan dat een faktor (die later het aktivatiehormoon bleek te zijn), afkomstig van het pars intercerebralis van het protocerebrum, de vervelling reguleerde.

Pas nadat Gomori (1941) de chroom-hematoxyline-phloxine kleuring en Halmi (1952) de paraldehyd-fuchsine kleuring, twee methodes waarmee men neurosekretorische cellen selektief kan aantonen in weefselcoupes, op punt gesteld hadden, is men de NSC volop gaan bestuderen.

Een uitgebreid overzicht van de Invertebrata, waartoe de insekten behoren, en de Vertebrata, waar NSC aangetoond werden, vindt men bij Gabe (1966).

De stoffen ("hormonen,, of "ergonen,,) die geproduceerd worden in de min of meer gelokaliseerde groepen NSC moeten door axonen naar een bepaalde plaats vervoerd worden om aan het bloed (haemolymfe) te kunnen afgegeven worden. Die plaatsen noemt men "neurohaemale,, organen. Als het hormoon afgegeven wordt, komt het volgens Schreiner (1966) los van zijn "carrier,, (draagstof) en kan het vrij in het bloed cirkuleren. Het corpus cardiacum is een typisch voorbeeld van een neurohaemaal orgaan. Al het neurosekretorisch materiaal uit de NSC wordt hier echter niet naar toe gevoerd. Het kan ook rechtstreeks naar de betreffende organen gevoerd worden (niet via het bloed) zoals de corpora allata, de spieren, de ovaria en de pericardiale cellen (Highnam & Hill, 1969).

Dat een NSC de kenmerken moet hebben van een neuron en een klier cel wordt gewoonlijk aangenomen. Het zou echter beter zijn te spreken van een neuron dat gespecialiseerd is in de vorming van vrij grote hoeveelheden van die substantie (hormoon). Op de vraag over het vermogen tot prikkelgeleiding van een neuron kan men zeer moeilijk antwoorden (Gosbee & al, 1968). De belangrijkste taak van deze neuronen is het reguleren van fysiologische processen die buiten het zenuwstelsel gelegen zijn.

Over de chemische aard van neurohormonen bij insekten is weinig gekend. Door de histologische kleuringsmethode wordt heel waarschijnlijk niet het hormoon, maar wel het carrier-proteïne gekleurd. Dank zij mikrochromatografische methoden heeft men wel kunnen aantonen dat afhankelijk van het onderzochte hormoon de hormonale substanties polypeptiden of oligopeptiden zijn.

De typering van de NSC is gesteund op de verschillen in samenstelling van het sekreet of het cytoplasma. De meest gebruikte kleurmethode is gesteund op de sterke affiniteit tussen de kleurstoffen en de hoge concentratie aan - S - S - bruggen en - SH groepen in het sekreetproteïne (carrier-proteïne).

Studies met de elektronenmikroskoop hebben aangetoond dat het aantal typen NSC groter is dan waar te nemen valt met konventionele histologische technieken. Zo kon Schooneveld (1970) de "Gomori-positieve" NSC bij de Colorado-kever indelen in 3 typen. Door het feit dat er verschillende typen NSC voorkomen is men geneigd te veronderstellen dat er meerdere hormonen door de hersenen zullen afgegeven worden.

Volgens Chapman (1969) is de hoeveelheid granulair materiaal dat op een bepaald ogenblik in een NSC aanwezig is, de resultante van de snelheid van synthese en de snelheid van afgifte. Sommige auteurs aanzien een NSC met zeer veel granulair materiaal als inactief, terwijl voor anderen dit verschijnsel het bewijs is van een grote aktiviteit.

Benevens Chapman (1969) kunnen Novak (1966), Gabe (1966), Gersch (1970), Smith (1968) en Joly (1968) hierover geraadpleegd worden.

3.2. b) Neurosekretorische cellen (NSC) van de ventrale ganglia

Een groot aantal NSC kunnen hier aangetroffen worden. Johansson (1958) stelde dit vast bij de wants (Oncopeltus fasciatus (Dallas)); Hsiao & Fraenkel (1966) telden ongeveer 48-54 NSC in het thoraco-abdominaal ganglion van de vlieg Phormia regina (Meigen); Köpf (1957) meldde 10-12 NSC bij Drosophila; Fletcher (1969) vond ook verschillende typen NSC terug in de ventrale ganglia van de kever Blaps mucronata. De NSC van het suboesofageaal ganglion horen hier ook bij.

Over de funktie van deze NSC is over 't algemeen weinig gekend. Het diurnaal aktiviteitsritme bij de kakkerlak Periplaneta wordt door de NSC van het suboesofageaal ganglion geregeld (Harker 1960). Volgens Arvy en Gabe (1952, 1953) zouden de prothoracale klieren bij de Odonata door neurosekretorische axonen van het suboesofageaal ganglion bezenuwd worden. Maddrell (1962) heeft vastgesteld dat de werking van de Malpighische vaten bij de wants Rhodnius direkt gekontroleerd wordt door een hormoon afgegeven aan het mesothoracaal ganglion. Dit hormoon (diuretisch hormoon) wordt door de medio-NSC gesynthetiseerd.

Een systeem van NSC werd door Fraenkel & Hsiao (1965) gevonden in de thoracale ganglia van de volwassen Calliphora vlieg. Deze NSC produceren het bursicon-hormoon dat verantwoordelijk is voor de kleur en het hard worden van de cuticula.

3.2. c) Corpora cardiaca (CC)

Deze paar aangelegde organen liggen achter de hersenen en zijn hiermee verbonden door zenuwvezels. In bijna alle insecten zijn de CC nauw verbonden met een gelijkaardig paar klierachtige organen, de corpora allata (CA), die bezenuwd worden door axonen die, komende van de hersenen, dwars doorheen de CC lopen. Bij de niet volwassen cyclorafe diptera zijn de CC en de CA in een "ring-klier,, (de Weismann-ring) verenigd omheen de aorta.

De CC bevatten de uiteinden van axonen die van de NSC uit de hersenen komen en neurosekreet opstapelen en afgeven. Ze bezitten zelf NSC die hormonen produceren, o.a. degene die de amplitude en de frekwentie van de hartslag regelen. Soms liggen de axonenuiteinden (opslagplaatsen) en de intrinsieke sekretorische cellen door elkaar, maar bij Apis mellifera (Van Laere, 1969) en Schistocerca (Cazal 1948 a, b) zijn het glandulaire en het nerveuse gedeelte duidelijk gescheiden.

De CC geven volgende hormonen af :

- a) prothoracotroop hormoon : het werkzame agens van het "brain hormone,, (Williams, 1952) zet de prothoracale klier aan tot produktie van ecdyson.
- b) neurotrope hormonen :
 - "neurotropic ecdysis hormone,, : wordt op een bepaald ogenblik van de dag afgescheiden in de poppen van de zijdevlinders Hyalophora cecropia en Antheraea pernyi. Dit leidt tot heftige bewegingen en ontpoppen van de vlinders (Trumann & Riddiford, 1970)
 - stimuleren van de spontane aktiviteit van de zenuwen (Gersch & al, 1970).
- c) hart-stimulerend hormoon (Mordue & Goldsworthy, 1969).

- d) hyperglycaemisch hormoon : verhoogt de trehalose concentratie in het bloed ten koste van glycogeenreserves in het vetweefsel (Bowers & Friedman, 1963 ; Normann & Duve, 1969 ; Goldsworthy, 1970). In Periplaneta stimuleert een hoeveelheid van 1/50 CC-homogenaat reeds voor 100 % de trehalosevorming (Steele, 1961).
- e) adipokinetisch hormoon : aktiveert in Schistocerca het vetweefsel tot afgifte van diglyceriden (functie : energiemobilisatie tijdens de vlucht) (Mayer & Candy, 1969 ; Goldsworthy & Mordue, 1971).

3.2. d) Corpora_allata_(CA)

De CA werden voor het eerst door Lyonet (1762) waargenomen. Nabert (1913) maakte een morfologische studie van de CA in bijna alle insektenorden. Hij stelde ook voor het eerst hun endocriene aard vast. Wigglesworth (1936) was de eerste om de rol van de CA gedurende de ontwikkeling (groei en voortplanting) bij Rhodnius aan te tonen.

De CA zijn kleine, gewoonlijk gepaarde, klierachtige organen, achter de CC gelegen en hiermee soms min of meer samengesmolten. Het zijn niet-nerveuse organen, elk langs een zijde van de oesofagus gelegen. Ieder CA is op zijn beurt nog verbonden met het suboesofageaal ganglion.

De CA vertonen sekretie-cycli waarmee veranderingen in grootte van sekretorische cellen geassocieerd gaan. Volgens Chapman is het niet geweten of iedere cel slechts één activiteitscyclus doormaakt alvorens afgebroken te worden, de cellen bestaan in ieder geval niet lang.

De CA produceren het juveniel hormoon (J.H.) dat de metamorfose regelt tijdens het larvestadium. Bij het volwassen insect worden de algemene metabolische activiteit, het voortplantingsgedrag, de dooierafzetting in de oöcyt, de spermatofoorafzetting en bij sprinkhanen de veranderingen in fase en kleur (Wigglesworth 1965) door dit hormoon beïnvloed. Röller & al (1967) hebben voor het eerst J.H. geïsoleerd uit de vlinder Hyalophora cecropia. Meyer & al (1970) hebben een tweede J.H.

geïsoleerd uit dezelfde vlinder waar C_2H_5 , ingeplant op de C_7 plaats, CH_3 geworden is. Röllner & Dahm (1970) hebben ook kunnen aantonen dat de CA J.H. in vitro kunnen afscheiden. Het J.H. en veel analoge zijn reeds gesynthetiseerd.

3.2. e) Prothoracale klieren

De prothoracale, thoracale of ventrale klieren ook peritracheale cellen genoemd, zijn paar en diffuus. Ze liggen achteraan in de kop of in de thorax. Ieder klier heeft dikwijls een uitgebreid nerveus gedeelte en is rijkelijk van tracheeën voorzien.

De prothoracale klieren produceren het vervellingshormoon ecdyson, zij worden onmiddellijk na de laatste vervelling tot volwassen insekt afgebroken. Butenandt & Karlson (1954) hebben het ecdyson voor het eerst geïsoleerd uit de zijderups Bombyx mori. Volgens King & Sidall (1969) en Moriyama & et. (1970) zou het ecdyson in het abdomen gevormd worden en niet in de prothoracale klieren. De oenocyten zouden volgens Bonner Weir (1970) betrokken zijn bij de uiteindelijke vorming van het β -ecdyson (het echte vervellingshormoon). Het α -ecdyson zou een efemere precursor zijn van het β -ecdyson. Volgens Romer (1971) zou het ecdyson tot in het laatste larvestadium gesynthetiseerd worden door de prothoracale klieren en de oenocyten; na het degenereren van de prothoracale klieren in het popstadium wordt het ecdyson dan nog alleen gevormd door de oenocyten.

3.3. De neuro-endocriene regulatie

De insektenhormonen hebben een tamelijk uitgebreid werkingsspectrum. Ze reguleren processen zoals vervelling, metamorfose, kleurverandering, diapauze en diurnale aktiviteitsritmen. Hormonen van eenzelfde orgaan kunnen verschillende processen beïnvloeden. Eenzelfde hormoon kan op verschillende organen een ander effect hebben.

De klierenaktiviteit, hun wisselwerking en deze met de geslachtsorganen b.v. wordt beïnvloed door zenuwprikkels, door neurosekreet transport langs axonen en door humorale factoren die door

de haemolymfe over heel het lichaam verspreid worden. Een voorbeeld hiervan geeft Engelmann (1962, 1970) in zijn beschrijving van de voortplantingscyclus bij het wijfje van de kakkerlak Leucophaea (fig. 7).

De prikkels verwekt in het genitaal apparaat van het wijfje tijdens de paring worden via het laatste abdominaal ganglion en de ventrale zenuwstreng naar de hersenen overgebracht, waar zij verhinderen dat de hersenen hun inhiberende invloed op de CA blijven uitoefenen. De aldus actief geworden CA synthetiseren en geven gonadotroop hormoon af dat dooierafzetting in de oöcyten en aktivering van de accessorische geslachtsklieren induceert. Na het afvoeren van rijpe eitjes naar de oötheek wordt de produktie van het J.H. door de CA opnieuw verhinderd. Dit gebeurt via een humoraal en nerveus mechanisme dat in werking treedt vanaf het ogenblik dat eitjes in de oötheek aanwezig zijn.

Ook uitwendige factoren zoals fotoperiode en temperatuur kunnen het neuro-endocrien systeem beïnvloeden. De Wilde (1953) ontdekte dat de fotoperiode de faktor was die het al dan niet in diapauze gaan van de Coloradokever reguleerde. Bij een lange-dag fotoperiode (16 uur licht) gaan de insekten zich voortplanten. Een kortere fotoperiode induceert diapauze. Het is het volwassen stadium dat de fotoperiode waarneemt en er ook op reageert. In geringere mate kunnen ook laatste stadium larven de fotoperiode waarnemen. Zij reageren er echter niet op. Een kortere dag fotoperiode inaktiveert de NSC uit de hersenen. De CA worden dus ook inaktief. Het zijn juist de inaktieve CA die het gehele diapauzesyndroom induceren (de Wilde, 1955 ; de Wilde & Stegwee, 1958; de Wilde & al, 1959 ; de Wilde, 1960 ; de Wilde & de Boer, 1960 ; de Wilde & de Boer, 1969).

De aktiviteit van de prothoracale klieren en de CA wordt bepaald door de NSC van de hersenen en het ophouden van hun werking gedurende de diapauze komt voor van de inaktiviteit van de NSC. Nog in verband met korte- of lange-dag fotoperiode stelde De Loof (1969) vast dat er in de haemolymfe van diapauze-kevers een zeer hoog eiwitgehalte aanwezig is (11 %) en dat er in afwezigheid

van het J.H. typische kortedag eiwitten in verschijnen die nooit voorkomen in kevers, gekweekt onder lange-dag omstandigheden.

CA en NSC moeten beiden aanwezig zijn voor de synthese van het vitellogeen "female proteïne," het voornaamste dooiereiwit (De Loof, 1969 ; De Loof & de Wilde, 1970).

In een artikel van Clift (1971) over de aktiviteit van het germarium en de dooiervorming in de oöcyten bij de vlieg Lucilia cuprina zien we de onderlinge beïnvloeding van het neurosekretorisch systeem, ovarium en voedselopname. Hoe bijzonder complex de wederzijdse beïnvloeding is blijkt uit fig. 8. Hieruit kan afgeleid worden dat er 2 onafhankelijke systemen mee betrokken zijn :

1. de produktie van het oöstatisch hormoon dat de groei van het ovariëel weefsel verhindert. Men neemt aan dat het germarium een onbeperkt aantal follikels kan produceren. Vanaf het ogenblik dat 3 follikels gevormd waren, begint dooierafzetting in de terminale oöcyt. Deze follikel brengt dan het oöstatisch hormoon voort, dat een verdere ontwikkeling van de voorlaatste oöcyt verhindert; dit gebeurt ofwel direkt ofwel via het CA. De 2 dooierloze follikels kunnen ook een stof voortbrengen die de werking van het germarium verhindert. Eiwitrijk voedsel brengt de dooierafzetting in de voorlaatste oöcyt op gang. De overblijvende dooierloze oöcyt kan gewoonlijk niet genoeg inhibitor meer voortbrengen om de werking van het germarium te verhinderen en hierdoor wordt er dan een nieuw follikel gevormd.
2. de synthese van neurosekretorisch materiaal, in het CC opgeslagen, voor de follikelcellen noodzakelijk is om zich inwendig te organiseren voor vitellogenese.

Het neurosekretisch materiaal komt waarschijnlijk vrij na het opnemen van eiwit. Wordt er geen eiwit opgenomen, dan verhindert het oöstatisch hormoon het loslaten van neurosekretorisch materiaal van het CC. Dit komt overeen met het effect dat Adams (1970) bereikte door oöstatisch hormoon te injecteren in Musca domestica.

In overeenstemming met de wederzijdse beïnvloeding van CA en NSC (Lea & Thomsen, 1969) is het volgens Clift niet onredelijk te veronderstellen dat het CA de synthese van het hogervermeld neurosekretorisch materiaal controleert en misschien ook het vrijkomen uit het CC.

HOOFDSTUK IV

MORFOLOGIE VAN HET NEUROSEKRETORISCH SYSTEEM

A. Algemeen

Een uitgebreide studie over de topografie en de histologie van de hersenen bij Diptera wordt gegeven door Groth (1971), terwijl Chapman (1969) een overzicht geeft van het zenuwstelsel en de endocriene organen.

In het hersenweefsel van insekten kan men gewoonlijk 3 gebieden onderscheiden : het protocerebrum, het deutocerebrum en het tritocerebrum. (fig. 9 - 10).

Het protocerebrum is tweelobbig en lateraal verbonden met de ooglobben. Bij hypognate insekten is dit gedeelte dorsaal in de kop gelegen. Het is het meest kompleks gedeelte van de hersenen. De perikarya zijn beperkt tot een perifere zone, terwijl het centraal gedeelte met neuropyleem bezet is. Anterodorsaal en langs beide zijden van de middellijn ligt er een massa cellen die het pars intercerebralis uitmaken. De voorste cellen van het pars intercerebralis zijn verbonden met de zenuwen van de cellen. De zenuwen van de meer lateraal gelegen cellen lopen naar het pons cerebralis, het middenste deel van het neuropyleem, dat met veel gedeelten van de hersenen in verbinding staat. In het pars intercerebralis liggen de mediane NSC (MNSC), waarvan de axonen elkaar kruisen en verder lopen buiten het hersenweefsel, o.a. naar het corpus cardiacum.

Aan weerszijden van het pars intercerebralis zijn de corpora pedunculata gelegen, die samengesteld zijn uit een calyx en een α - en β -lob.

In het midden van het neuropyleem ligt het centraal lichaam waarheen axonen van veel gedeelten van de hersenen naar toe lopen. Lateroventraal hiervan ligt er nog een accessorische lob die ook tot het neuropyleem behoort.

De ooglobben zijn laterale vertakkingen van het protocerebrum naar de kompleksogen toe. Ieder lob is samengesteld uit drie delen :

de lamina ganglionaris, de medulla externa en de medulla interna.

Het deutocerebrum is uitwendig te onderscheiden door de aanwezigheid van de lobi olfactorii. Dorsaal van iedere lob ontspringen de zenuwen van de antennen.

Het tritocerebrum, dat bestaat uit 2 kleine lobben is met konnektieven aan het suboesofageaal ganglion verbonden. De nervi labralis en de 2 frontaalkonnektieven ontspringen eveneens op het tritocerebrum. De frontaalkonnektieven verenigen zich in het frontaal ganglion. Vanaf dit ganglion vertrekt de nervus recurrens die in het hypocerebraal ganglion uitmondt. Frontaal en hypocerebraal ganglion behoren tot het sympathisch zenuwstelsel.

Het eerste ganglion van de ventrale zenuwstreng is het suboesofageaal ganglion. Dit ganglion is samengesteld uit de versmelting van de mandibulaire, maxillaire en labiale segmenten. Typisch zijn de drie thoracale ganglia, elk met vijf of zes zenuwen aan elke zijde die de spieren, de sensilla en de aanhangsels van de thorax bezenuwen. De abdominale ganglia zijn kleiner dan de thoracale en kunnen soms sterk versmolten zijn.

De morfologie der endocriene organen bij insekten is uitgebreid beschreven door Cazal (1948). Deze van Calliphora erythrocephala heeft Possompès (1953) zeer gedetailleerd beschreven.

B. Delia brassicae

Bij de Diptera en ook bij Delia brassicae zijn proto-, deuto- en tritocerebrum uitwendig niet van elkaar te onderscheiden. Het deutocerebrum kan men localiseren door na te gaan waar de zenuwen naar de antennen ontspringen. Het tritocerebrum kan men situeren door de nervi labralis en de frontaalkonnektieven op te zoeken.

Het suboesofageaal ganglion is helemaal vergroeid met het tritocerebrum. Ventraal geeft dit ganglion ontstaan aan de cervikaal konnektief dat verbonden is met het thoracaal ganglion (fig. 11). Thoracale en abdominale ganglia zijn vergroeid tot één thoraco-abdominaal ganglion (fig. 11).

De ligging van de NSC in het pars-intercerebralis en in het thoraco-abdominaal ganglion werd aangeduid met de "in situ" kleuring volgens Dogra & Tandan (1964) (2, 2, 5) (fig. 12, 13, 14). Door op

deze wijze te kleuren zien we op fig. 11 dat de MNSC uit 2 groepen bestaan, symmetrisch gelegen t.o.v. de medio-dorsaal lijn van de hersenen. De methode van Dogra & Tandan werd nog maar door enkele onderzoekers met succes toegepast ; o.a. door Gosbee & al (1968) bij de kakkerlak Periplaneta americana, door Gillott (1969) op de libel Coenagrion angulatum en door Burgess (1971) op de mug Culiseta inornata.

De NSC en de verschillende gebieden van het hersenweefsel werden aangeduid op met PAF- en CHP gekleurde coupes van het hersenweefsel (fig. 15, 16). De loop van de axonen der MNSC werd aangetoond op fig. 17.

De endocriene organen CC en CA zijn bij Delia brassicae, zoals bij alle cyclorafe Diptera in de prothorax gelegen (fig. 11, 18). Ze zijn ongepaard en liggen respektievelijk onder en boven de aorta. Het CA is dikwijls asymmetrisch gelegen, zoals bij Calliphora (M. Thomsen 1969). Beiden zijn verbonden door 2 nervi corporis alati, één langs ieder zijde van de aorta. In het larve- en popstadium en in de pas ontloken vlieg komen daar nog de thoracale klieren bij. Volgens M. Thomsen (1969) zijn deze thoracale klieren bij de volwassen vlieg pas na 2-3 dagen verdwenen. Op fig. 19 ziet men het CA met de thoracale klieren van een pas ontloken koolvlieg. Op fig. 20 ziet men alleen nog het CA bij oudere vliegen. Het CA, CC en thoracale klieren vormen samen rond de aorta een ringvorming kompleks dat men de "Weismann-ring" noemt (alleen bij de cyclorafe Diptera !). Volgens E. Thomsen (1942) is bij Calliphora erythrocephala het CC gedeeltelijk vergroeid met het hypocerebraal ganglion. Bij de koolvlieg is dit eveneens zo (fig. 21, 22). Dit kompleks is verder met de hersenen verbonden via de nervus recurrens (de "cardiac - recurrent nerve" volgens E. Thomsen, 1954). De nervi corporis cardiaci 1 en 2, komende van de MNSC en de laterale NSC zijn versmolten met de nervus recurrens. Achter het hypocerebraal ganglion vindt men 2 paar zenuwen: de nervi oesophagei, die de ductus ingluviei bezenen en de zenuwen van de aorta die verder naar achter lopen langs weerszijden ervan (fig. 23, Normann & Duve, 1969). Het CC en het hypocerebraal ganglion liggen in de driehoek : oesofagus, aorta en proventriculus.

HOOFDSTUK V

HISTOLOGIE VAN DE NEUROSEKRETORISCHE CELLEN VAN DE HERSENEN

5.1. Inleiding

5.1.1. Definitie NSC

E. Scharrer (1962) noemt neurosekretorische cel niet alleen een cel met neurosekretorische granula ; zij mag geen synapsen vormen met andere neuronen of effektororganen. Hun axonen eindigen op plaatsen waar het neurosekretorisch materiaal aan het bloed kan afgegeven worden.

Volgens Gabe (1966) zijn NSC elementen die de eigenschappen van neuronen hebben en bovendien morfologische kenmerken vertonen van een klierenactiviteit (intracellulaire synthese en afgifte in de cel van een histologisch aantoonbaar sekretorisch produkt).

Fletcher (1969) noemt neuronen NSC vanaf het ogenblik dat hij cytologisch kan aantonen dat er sekretie is.

Volgens Jenkin (1970) heeft men door het gebruik van de elektronenmikroskoop cellen gevonden die de typische granula van NSC bevatten en die vroeger niet als neurosekretorisch herkend werden. De aanwezigheid van granula met een diameter tussen de 500 en 3000 Å is wellicht het beste criterium om een neuron als neurosekretorisch te beschouwen.

De voortdurende toename van kennis over nieuwe soorten NSC maakt het echter buitengewoon moeilijk om er een goede definitie aan te geven.

5.1.2. Terminologie

Gewoonlijk spreekt men van Gomori - positieve en Gomori - negatieve cellen. De Gomori - positieve NSC kleuren intens door kleuringen uitgevoerd volgens de oorspronkelijke formules van Gomori : a. chroomhematoxyline - phloxine (CHP) (Gomori 1941) ; b. paraldehyd-fuchsine (PAF) (Gomori 1950) ; Gomori - negatieve cellen worden gekleurd tijdens de tegenkleuring.

Nayar (1955) kleurde de NSC van de hemipteer Iphita limbata met CHP ; de cellen waarvan de cytoplasma-inhoud donker blauw kleurde noemde hij "A - cellen," ; degene die rood kleurden noemde bij "B - cellen,". Het paraldehyd-fuchsine echter bekwam hij geen selectieve kleuring.

Highnam (1961) vermeldt ook nog C- en D cellen in het pars intercerebralis van de sprinkhaan Schistocerca gregaria.

Johansson (1958) heeft eveneens 4 celtypen bij de wants Oncopeltus fasciatus (Dallas)bepaald : de A - cellen die donker purper kleurden met PAF en blauw-zwart met CHP ; de B - cellen die groenachtig of blauw-groen kleurden met PAF en rood met CHP ; de C - cellen die purper kleurden met PAF en roodachtig met een purpere tint met CHP ; de D - cellen die purperachtig kleurden met PAF en licht blauw-zwart met CHP.

Highnam en Johansson noemden de C- en D-cellen echter niet neurosekretorisch omdat er geen granula in hun axonen gevonden werden, en dit is juist een van de criteria waaraan per definitie volgens B. Sharrer & E. Sharrer (1954) moet voldaan zijn om een cel neurosekretorisch te noemen. Volgens Highnam gelijken de D-cellen zeer goed op grote motorische neuronen die in dat gedeelte van de hersenen aanwezig zijn. Highnam vermeldt de C-en D-cellen omdat hun axonen samen met deze van de A- en B-cellen doorheen het hersenweefsel lopen wat laat veronderstellen dat de C-en D-cellen in verband staan met neurosekretie en hormonen.

Hsiao & Fraenkel (1966) vermelden eveneens 2 typen NSC bij de dipteer Phormia regina Meigen : A - cellen waarvan de cytoplasmainsluitels purper gekleurd werden met PAF en donker blauw met CHP ; B - cellen met een groen gekleurd cytoplasma door PAF en rood door CHP. Volgens deze auteurs is PAF betrouwbaarder en gevoeliger dan CHP. Dit kwam vooral tot uiting bij pas ontloken vliegen.

Fletcher (1969) heeft zich niet aan het vier- typen systeem bij de beoordeling van het neurosekretorisch systeem van de larve en de volwassen kever Blaps mucronata gehouden. Hij beschrijft 13 verschillende celtypen die een sekretorische activiteit vertonen. Hij vond bij de larve celtypen die niet meer

aanwezig waren bij het volwassen insekt.

Schooneveld (1970) vermeldt 8 typen NSC in de hersenen en in het suboesofageaal ganglion van Leptinotarsa decemlineata Say. Om de mogelijkheid uit te sluiten dat sommige typen verschillende stadia in de aktiviteitscyclus van één enkel NSC - type zouden vertegenwoordigen heeft hij verschillende kleuringen uitgevoerd op Coloradokevers die zich in verschillende ontwikkelingsstadia bevonden.

5.2. Paraldehyd-fuchsine kleuring van de verschillende typen NSC

5.2.1. PAF - kleuring van de MNSC

5.2.1.1. Typen NSC in het pars intercerebralis bij de koolvlieg

In 5.1.2. is beschreven hoe men te werk gaat bij het typeren van een NSC. De PAF - of CHP - kleuring of beide samen werden gebruikt voor de typering van de NSC. Zoals reeds vermeld in 2, 4, b is de CHP- kleuring bij Delia brassicae nooit geslaagd. Volgens de literatuur waren de resultaten van de PAF- en de CHP - kleuring bij andere insecten steeds in overeenstemming. Hierdoor dachten we onze naamgeving enkel op de PAF kleuring te mogen steunen.

Om de typering zo goed mogelijk door te voeren, hebben we de hersenweefsels frontaal, dwars en sagittaal doorgesneden.

De NSC die het meest gekleurd waren (donker purper) hebben we "A," type-cellen genoemd. Ze zijn 12 à 17 μ groot en peer- of ellipsvormig (fig. 24, 25, 26).

Een tweede soort, eveneens purper gekleurd, maar met fijne sekretie-granulaties in het cytoplasma in tegenstelling met deze van de A - cellen, hebben we "A₁" type - cellen genoemd (12 à 19 μ , ster- of ellipsvormig) (fig. 24, 27).

Een derde soort, door de tegenkleuring groen of grijsgroen gekleurd, hebben we "B," type-cellen genoemd (14 à 22 μ , rond of ellipsvormig) (fig. 25, 28).

De metingen zijn uitgevoerd met het meetoculair 10 x K Wild op de M₂₀ mikroskoop van WILD.

Deze verschillende typen MNSC-cellen bij Delia brassicae zijn teruggevonden bij de 4 ontwikkelingsstadia beschreven in 2.1.4. Coupes van het hersenweefsel van de mannelijke vliegen

van het popstadium (enkele dagen voor het ontpoppen), van 0-3 uur oud, van 2 tot 3 dagen oud en van 6 tot 7 dagen oud werden eveneens op dezelfde manier gekleurd. We hebben nooit een verschil gezien met de MNSC van de wijfjes.

Fletcher (1969) vond bij de kever Blaps mucronota eveneens geen verschil tussen de NSC van de mannetjes en deze van de wijfjes.

Opmerking :

Bij wijfjes van dag 6-7 met volwassen eitjes die niet konden afgelegd worden door afwezigheid van kopulatie- en ovipositiemogelijkheid, is het ons opgevallen dat de helft der A-cellen zeer donker ~~purpere~~ granulaties in het cytoplasma hadden. In het cytoplasma van de rest der A-cellen waren er minder donker purperegranulaties aanwezig terwijl de oranje kleur (chromotroop 2 R) van de tegenkleuring meer tot uiting kwam.

Bij de B-cellen werd ongeveer hetzelfde verschijnsel waargenomen : het cytoplasma van de helft der cellen was bleekgroen gekleurd terwijl het bij de andere helft lichtjes bruin-groen was gekleurd.

5.2.1.2. Aantal NSC in het pars intercerebralis bij de koolvlieg

De telling werd uitgevoerd op 5 μ -coupes. Hiervoor hebben we hersenweefsel genomen van de 4 hogervermelde stadia (2, 1, 4) die hiervoor hetzij frontaal hetzij dwars gesneden werden. Daar een NSC een maximale diameter van 17 à 22 μ kan hebben werden telkens 3 opeenvolgende coupes vergeleken om te vermijden dat één NSC twee of drie maal zou geteld worden.

Om de onderlinge vergelijking van de coupes te vergemakkelijken werd met behulp van een tekenspiegel een situatieschets gemaakt en hierop werd aangeduid welke cel voor de telling in aanmerking kwam (steunend op de variatie in kerndiameter).

Het aantal MNSC bij de koolvlieg bedraagt ongeveer 34. Hiervan behoren er ongeveer 20 tot het A-type, 4 tot het A₁-type en 10 tot het B-type. De 4 A₁-type cellen liggen afzonderlijk en ventraal t.o.v. de andere MNSC (fig. 12).

5.2.1.3. Aantal NSC in het pars intercerebralis bij andere insekten

Volgende tabel geeft ter vergelijking het aantal MNSC bij enkele andere insekten.

orde	soort	auteur(s)	aantal MNSC
Homoptera	Myzus persicae	Johnson 1963	2
Heteroptera	Oncopeltus fasciatus	Johansson 1958	32 à 36
	Iphita limbata	Nayar 1955	32
Odonata	Coenagrion angulatum	Gillott 1969	66 à 76
Coleoptera	Blaps mucronata	Fletcher 1969	48 à 52
	Leptinotarsa decemlineata	Schooneveld 1970	148 à 158
Hymenoptera	Apis mellifera (koningin)	Herrmann 1969	100 à 120
Diptera	Aedes taeniorhynchus	Lea 1967	+ 20
	Phormia regina	Hsiao & Fraenkel 1966	20 à 32
	Drosophila funebris & hydei	Köpf 1957	24 à 36
	Calliphora erythrocephala	M. Thomsen 1954	26 à 37(1)

Volgens Highnam (1961) kan het pars intercerebralis gebied van het protocerebrum van een insekt een groot aantal kleine of een klein aantal grote NSC bevatten. Volgens hem bestaat er een konstante verhouding tussen het totaal volume NSC en de lichaamsgrootte.

(1) 26 à 37 MNSC : hierin zijn de 10 "giant neurons" begrepen die wij B-cellen genoemd hebben.

5.2.2. PAF - kleuring van de laterale cellen

5.2.2.1. Literatuurgegevens

Laterale NSC zijn reeds in het protocerebrum van veel insecten aangetoond (Hanström 1940, Cazal 1948, Arvy and Gabe 1952, Gabe 1954 en Wigglesworth 1964, Schooneveld 1970).

Zij zijn in bijna alle insecten aanwezig, alhoewel M. Thomsen (1954) ze niet gevonden heeft bij enkele Hymenoptera. Füller (1960) vond ze evenmin bij de kakkerlakken Blatta orientalis en Periplaneta americana.

E. Thomsen (1952) heeft 2 groepen laterale cellen gevonden bij Calliphora erythrocephala; iedere groep bestond uit 3 cellen. Het wegnemen van deze cellen verhinderde de ei-ontwikkeling in 10 van de 14 behandelde vliegen.

Volgens Williams (1948) kan de diapauze van een zijdevlinder Hyalophora cecropia slechts doorbroken worden door implantatie van een hersenkompleks dat zowel de MNSC als de laterale cellen bevat. Van der Kloot heeft dit in 1960 bevestigd.

Strong (1965) heeft aangetoond dat de aktiviteit van de CA bij de sprinkhaan Schistocerca sp. geregeld wordt door tussenkomst van de laterale neurosekretorische celkompleksen.

M. Thomsen (1965) bevestigt de aanwezigheid van 2 groepen van 3 laterale cellen bij Calliphora erythrocephala. Hiervan liggen er 2 juist onder het perineurium, terwijl de derde cel dieper tussen de zenuwcellen gelegen is. Ze zijn duidelijk phloxinofiel (meer donkerrood dan de omgevende zenuwcellen) met een CHP-kleuring. Door een PAF-kleuring worden deze cellen oranje of groen gekleurd. Volgens M. Thomsen is er een zeer fijne granulatie te zien in het cytoplasma van deze cellen. Deze is echter niet zo duidelijk als bij de MNSC. Deze laterale cellen bij Calliphora erythrocephala zijn onregelmatig van vorm en vertonen dikwijls 1 of 2 uitlopers. De axonen zelf heeft hij niet kunnen onderscheiden.

Volgens Fletcher (1969) komen er bij Blaps mucronata eveneens 2 groepen laterale cellen voor in het dorsaal gebied buiten het pars intercerebralis. Ieder groep bestaat uit 7 tot 12 cellen en deze zijn dan nog van 2 verschillende typen. Het aantal van de ene zijde kan volgens Fletcher verschillend zijn van die van de andere zijde.

Bij Leptinotarsa decemlineata (Schooneveld 1970) komen er ook 2 typen laterale (L) cellen voor. Hun aantal kan erg schommelen : van 5 tot 25 langs 1 zijde.

Crosswhite & Medler (1966) vonden geen laterale cellen bij Bombus fervidus Fabricius. Van der Kloot had hierover reeds in 1960 geschreven dat bij de hoger geëvolueerde insecten (vliegen en bijen) het gebied van de laterale cellen met dit van de MNSC versmolten was en hierdoor de MNSC en de laterale NSC niet meer afzonderlijk te onderscheiden waren.

5.2.2.2. Onderzoek bij de koolvlieg

De laterale NSC bij Delia brassicae behoren tot het B-type. Na een PAF-kleuring is het cytoplasma groen gekleurd. Een zeer fijne granulatie is zichtbaar. Zij zijn 14 à 16 μ groot en ellipsoïdaal, soms met 1 of 2 konische uitlopers (fig. 30).

Het aantal laterale NSC bij de koolvlieg bedraagt zes. Langs beide zijden van de MNSC liggen er telkens drie, waarvan er altijd twee samen voorkomen. De derde ligt meer naar het neuropyleem toe. Ligging : zie fig. 29. Ze worden gemakkelijkst teruggevonden in coupes van frontaal gesneden hersenen.

5.2.3. PAF-kleuring van NSC aan de lobus opticus in het popstadium

5.2.3.1. Literatuurgegevens

M. Thomsen (1965) vermeldt de aanwezigheid van 1 - (2) cellen aan de basis van iedere ooglob bij Calliphora erythrocephala.

Hsiao & Fraenkel (1966) stellen 2 groepen van drie A-cellen vast aan de voorste grens van de hersenen naast de lobus opticus bij Phormia regina.

5.2.3.2. Onderzoek bij de koolvlieg

Zowel bij de mannelijke als bij de vrouwelijke pop liggen er buiten de MNSC en de laterale NSC een groot aantal NSC in het hersenweefsel (fig. 31, 32). Een zeer groot aantal is gelegen aan de lobus opticus (grenzend aan de medulla interna anterior). Bij de volwassen vlieg werden er daarentegen soms 2 of 3 cellen teruggevonden.

De cellen zijn van het B-type. Ze zijn grijs-groen gekleurd in tegenstelling met de laterale cellen die groen gekleurd zijn. Ze zijn 10 à 17 μ groot en ellipsoïdaal (fig. 33). Aan ieder zijde liggen er ongeveer 60 NSC.

5.2.4. PAF-kleuring van NSC in het suboesofageaal ganglion

5.2.4.1. Literatuurgegevens

Alleen M. Thomsen (1965) en Hsiao & Fraenkel (1966) hebben reeds NSC in het suboesofageaal ganglion van Diptera opgemerkt. M. Thomsen vermeldt 2 A-cellen bij Calliphora erythrocephala. Hsiao & Fraenkel beschrijven 6 NSC, waarvan 2 A-cellen en 4 B-cellen bij Phormia regina.

5.2.4.2. Onderzoek bij de koolvlieg

Aan deze cellen werd niet veel aandacht besteed omdat het suboesofageaal ganglion tot de ventrale ganglia gerekend wordt. Wegens de speciale structuur (vergroeiing met het tritocerebrum) bij de Diptera werd dit ganglion samen met het hersenweefsel onderzocht.

De cellen zijn van het B-type. Ze zijn groen gekleurd. Ze meten 17 à 26 μ en zijn rond of ellipsoïdaal (fig. 34, 35). Hun aantal bedraagt 4 (2 groepen van 2 cellen langs de zijkanten van het neuropyleem van het ganglion gelegen). Een paar maal werden meer ventraal 2 afzonderlijk gelegen cellen opgemerkt.

5.3. Chroom - hematoxyline - phloxine kleuring

Zoals reeds hoger beschreven 2, 4 b gaf deze kleurmethode

nooit het verwachte resultaat. De blauwkleuring van sekretieprodukten in de NSC (evenals andere elementen van het weefsel zoals basale membranen) was zeer zwak of trad helemaal niet op. Hierdoor was de phloxine-kleuring dan telkens te overheersend waardoor deze kleuring dan waardeloos werd voor het gestelde doel.

Opmerking : deze kleuring deed de kleinste details van het hersenweefsel buitengewoon goed uitkomen, zodat dit een goede overzichtskleuring gaf.

5.4. Alcian - blauwkleuring

5.4.1. Literatuurgegevens

Door Lev & Spicer (1964) werd vastgesteld dat sulfaatgroepen met alcian blauw bij lage pH gekleurd worden. Zij hebben verder opgemerkt dat alle zure mucopolyssachariden (zowel de carboxyl- als de sulfaathoudende mucosubstanties) gekleurd worden bij een pH = 2,5 en dat alleen de sulfaathoudende-bestanddelen kleuren met alcian-blauw bij een pH = 1 of pH = 0,5.

5.4.2. Onderzoek bij de koolvlieg

Alcian-blauwkleuring, uitgevoerd volgens Lev en Spicer, kleurt het neurosekreet niet. Het bevat dus geen zure mucopolysacchariden. Als de coupes echter eerst geoxydeerd worden met KMnO_4 , wordt het neurosekreet (vooral in de A-cellen) zeer duidelijk blauw gekleurd (fig. 36). De kleurreactie gaat op zowel bij pH 2,5 ; pH 1,0 en pH 0,5. Dit betekent dat sterk zure $-\text{SO}_4^{--}$ of $-\text{SO}_3^-$ groepen verantwoordelijk zijn voor de reactie. Men kan dus besluiten dat KMnO_4 behandeling deze sulfaat of sulfonzure groepen doen ontstaan heeft uit cysteïne en cystine, aminozuren die ingebouwd zitten in de eiwitketens in het neurosekreet. Onrechtstreeks werd dus bewezen dat vooral het neurosekreet in de A-cellen rijk is aan -S-S- bruggen en (of) -SH groepen.

5.5. Fluorescentie

5.5.1. Literatuurgegevens

Schiebler (1958) en Adam (1960) hebben voor het eerst ge-

wezen op de metachromatische reactie van geoxydeerd neurosekreet met pseudoisocyanine. Deze methode werd door Sterba (1961 a, b) aangepast voor de fluorescentiemikroskoop.

Het neurosekreet dat bij vertebraten en insecten Gomori-positief reageert in histologische coupes, geeft na oxydatie met N, N' - diethylpseudoisocyaninchloride, een metachromatische reactie. In de fluorescentiemikroskoop geeft deze metachromatische pseudoisocyanine een sterke, gele secundaire fluorescentie, waardoor de kleinste hoeveelheden neurosekretorisch materiaal te zien zijn. Om deze laatste reden heeft Zimmerman (1967 a, b, 1970) deze methode gebruikt om de structuur en de regeneratie mogelijkheden van het neurosekretorisch systeem van de regenworm Lumbricus terrestris te bestuderen.

De reactie berust volgens Sterba (1964) op de polymerisatie van monomere pseudoisocyanine in aanwezigheid van dicht bij elkaar gelegen (4 - 5 Å) zure groepen, overwegend SO₃H-groepen. Deze SO₃H groepen ontstaan niet alleen door oxydatie van cystine naar cysteïne zuur of van cysteïne naar cysteïne zuur. Er zijn waarschijnlijk altijd SO₃H groepen aanwezig, maar niet in voldoende mate om een duidelijke fluorescentie te verkrijgen en hierom doet men deze sterk zure groepen secundair ontstaan door oxydatie van proteïnegebonden cystine en cysteïne.

5.5.2. Onderzoek bij de koolvlieg

Met de methode van Sterba (1961, b) gaven de A-cellen (Gomori-positieve) een zeer sterk gele fluorescentie (fig. 37) evenals het neurosekretorisch materiaal in de axonen waardoor hun loop in de hersenen zeer goed te volgen was (fig. 17, 38).

De oesofagus gaf eveneens een fluorescentie (fig. 17). B-cellen (Gomori-negatieve) en de rest van het weefsel waren oranje-rood tot donkerrood gekleurd.

Sterba & Hoheisel (1964) verkregen bij de vlieg Lucilia caesar belijkaardige resultaten.

5.6. Samenvatting

In onderstaande tabel worden de resultaten weergegeven van de PAF-kleuring van NSC in het hersenweefsel en het suboesofageaal ganglion.

	Type	PAF - kleuring	Vorm	Afmetingen	Aantal
MNSC	A	donker purper	peer- of ellipsvormig	12 - 17 μ	± 20
	A ₁	purper (fijne granulaties)	ster- of ellipsvormig	12 - 19 μ	4
	B	groen of grijs-groen	rond- of ellipsvormig	14 - 22 μ	10
Late- rale NSC	B	groen	ellipsvormig	14 - 16 μ	6
NSC aan lobus opticus in pop- stadium	B	grijs-groen	ellipsvormig	10 - 17 μ	± 120
NSC in suboe- sofage- aal gangli- on	B	groen	rond- of ellipsvormig	17 - 26 μ	4 (+ 2?)

Alcian-blauwkleuring heeft aangetoond dat de A-cellen geen zure mucopolysacchariden bevatten. Het neurosekreet in de A-cellen is echter wel rijk aan -S-S-bruggen en (of) -SH groepen.

Met de fluorescentie-methode hebben we uiterst kleine hoeveelheden neurosekreet in de axonen kunnen aantonen.

HOOFDSTUK VI

ELEKTRONENMIKROSKOPISCH ONDERZOEK VAN DE MNSC

VAN DE HERSENEN BIJ DE KOOLVLIEG

6.1. Literatuurgegevens

De eerste publikaties over de ultrastructuur van NSC uit de hersenen van insekten zijn verschenen rond 1960. Volgende auteurs hebben de ultrastructuur van NSC bij insekten beschreven :

- Nishiitsutsuji - Uwo (1960, 1961) bij rupsen van de vlinders Bombyx sp. en Philosamia sp.
- Bern, Nishioka & Hagadorn (1961) bij de kakkerlak Periplaneta americana.
- Stiennon & Drochmans (1961) bij 2 phasmiden.
- Willey & Chapman (1962) bij de kakkerlak Blaberus carniifer.

Vanaf die periode zijn regelmatig werken verschenen over de ultrastructuur van NSC in de hersenen van insekten. Het meest interessante voor ons werk was dit van Bloch & al. (1966) over de MNSC bij Calliphora erythrocephala. Het feit dat reeds zeer veel bekend was over de funktie van de MNSC bij Calliphora erythrocephala (1) belette Bloch & al. niet om bij dit insekt een gedetailleerd cytologisch onderzoek over de MNSC uit te voeren.

Bloch & al. vonden een grote overeenkomst tussen, enerzijds de hoeveelheid neurosekretorisch materiaal zichtbaar in de levende NSC en in gekleurde preparaten en anderzijds het aantal granula zichtbaar in de NSC door elektronenmikroskopisch onderzoek.

Bij Calliphora erythrocephala vonden zij 2 typen MNSC : MNC I met granula diameter van ± 2000 à 3000 \AA en MNC II met granula diameter van ± 1000 à 1500 \AA . Bloch & al. zijn de eersten geweest om met zekerheid te beweren dat een bepaalde MNSC die zij met de

(1): Thomsen (1948, 1952) : belangrijke rol bij de regulatie van de eiontwikkeling ; Thomsen (1956) : groei van de oenocyten ; Thomsen & Müller (1959, 1960, 1963) : de produktie van proteolytische enzymen door de cellen van de middendarm.

elektronenmikroskoop (EM) onderzochten overeenkwam met een bepaalde MNSC die zij met de lichtmikroskoop zagen. Volgens hen was dit te danken aan het veelvuldig onderzoek dat zij met levende cellen gedaan hebben (Thomsen E & M, 1954). M. Thomsen dacht in 1965 dat de kleinste granula zichtbaar na paraldehydfuchsine kleuring in coupes de grootste granula konden voorstellen. De granula in gekleurde coupes te zien met de lichtmikroskoop zijn in werkelijkheid aggregaten waarin de elementaire granula niet kunnen onderscheiden worden.

Het Golgi-systeem dat de sekreet-granula vormt bestaat uit een aantal dicht bij elkaar gelegen agranulaire cisternae, waarvan de profielen nogal kunnen verschillen naargelang de richting waarin ze doorgesneden werden. De meest karakteristieke zijn deze waarbij de cisternae er als dubbele, evenwijdig lopende, vlakke of gewelfde membranen uitzien, een smalle intercisternale ruimte omsluitend.

Bloch & al. kennen een belangrijk aandeel toe aan het Golgi-systeem voor de vorming van neurosekretorische granula, die afgesnoerd worden aan de cisternae en omgeven door een membraan afkomstig van de agranulaire Golgi cisternae. Zij hebben echter geen elektronendicht materiaal gezien in het tubulair gedeelte van de cisternae bij Calliphora erythrocephala. De Golgi-systemen bij vliegen in een jong stadium schenen meer ontwikkeld te zijn dan deze van oude met suiker gevoede vliegen zodat door eerstgenoemde meer granula gevormd werden dan door laatstgenoemde. Dit kwam goed overeen met de resultaten van Lea & E. Thomsen (1962) bekomen met lichtmikroskopische studies over de hogere synthese mogelijkheden van de MNSC bij jonge met suiker gevoede vliegen en met vlees gevoede vliegen in vergelijking met deze van oude met suiker gevoede vliegen.

In MNC I die zeer veel elementaire granula produceren liggen deze echter zeer verspreid, wat zou wijzen op een vlugge afgifte van granula. In tegenstelling hiermee zijn de MNC I van oude met suiker gevoede vliegen volgepropt met elementaire granula, wat er op wijst dat de granula opgeslagen worden. Deze bevindingen onder-

steunden de interpretatie naar voor gebracht door E. Scharrer & Brown (1961) bij de regenworm Lumbricus terrestris en door Bern & al. (1961) bij een bloedzuiger Theromyzon sp., dat NSC die volgepropt zitten met elementaire granula en waarvan het Golgi-systeem zeer gereduceerd is, waarschijnlijk in een fase verkeren waarin de granula opgeslagen worden.

Het ruw endoplasmatisch reticulum (RER) van MNC I bij jonge met suiker gevoede vliegen en met vlees gevoede vliegen is goed ontwikkeld en vormt cisternae tussen de groepen elementaire granula. Bij minder actieve cellen van oude met suiker gevoede vliegen komt het endoplasmatisch reticulum (ER) bijna niet voor in de middenste zone van het cytoplasma dat volgepropt zit met elementaire granula waartussen massa's vrije ribosomen liggen. De meest aanvaardbare verklaring voor deze waarnemingen is een stijgende desintegratie van het ER naarmate het sekretorisch materiaal zich meer en meer ophoopt; membranen zijn immers dynamische structuren die kunnen worden afgebroken en opgebouwd (E. Scharrer & Brown, 1961). Willey & Chapman (1962) hebben bij Blaberus sp. ook een periodische desintegratie en rekonstruktie van ER gezien in korrelatie met fasen in de vervellingscyclus.

De "giant neurons" bij Calliphora erythrocephala zijn cellen met een hoge metabolische aktiviteit. Ze bevatten granula (500 - 700 Å) die ogenschijnlijk ook door het Golgi-systeem afgescheiden worden. Volgens Bloch & al. is het aantal granula echter te klein om deze cellen neurosekretorisch te noemen.

Monneron & Bernard (1966) hebben met pronase o.a. de eiwitachtige natuur van sekretie granula in NSC van de voor- hypofyse van een jonge vrouwelijke rat kunnen aantonen. Het weefsel was dubbel gefixeerd en ingebed in Epon. Hiermee hadden ze eveneens aangetoond dat het mogelijk was om na OsO_4 - fixatie en inbedding in Epon een pronase-reaktie met sukses uit te voeren. Volgens Aldridge & Watson (1963) en Yotsuyanagi & Guerrier (1965) kon men met deze reaktie alleen resultaat verkrijgen op voorwaarde dat men ofwel gedurende zeer korte tijd gefixeerd had met een aldehyde ofwel met kaliumpermanganaat 5 % (voor plantaardig materiaal).

In dit laatste geval had men een zeer lange verteringstijd (7 à 24 uur) nodig.

Om polysacchariden aan te tonen gebruikte Thiéry (1967) thiosemicarbzide of thiocarbohydrazide. Deze scheikundige stoffen reageren met de aldehyd-groepen die ontstaan in de polysacchariden na perijoodzuur-behandeling. De thio-groepen worden zichtbaar gemaakt met osmiumtetroxide-dampen of zilverzouten. Thiéry bekomt een kontrastrijk beeld met zilverproteïneaat. Op deze manier worden neutrale en zure eenvoudige (niet komplexe) polysacchariden, mucopolysacchariden en mucoproteïnen aangetoond. King & Aggarwal (1965), Noirot & al. (1967) en Rosa & Johnson (1967) hebben deze methode reeds met sukses toegepast.

6.2. Onderzoek bij de koolvlieg

Gedurende heel het elektronenmikroskopisch onderzoek hebben we het verband gelegd tussen de NSC die we met de lichtmikroskoop konden waarnemen en de NSC die we met de elektronenmikroskoop vaststelden. De typering van de NSC in het histologisch onderzoek kan volledig behouden worden voor hetgeen we elektronenmikroskopisch gezien hebben en daarom zullen we de NSC A-, A₁-, en B-cellen blijven noemen. De indeling bij elektronenmikroskopisch onderzoek is gesteund op de grootte van de diameter van de elementaire granula. Cassier & Fain-Maurel (1970 a-b) hebben zich ook gesteund op de elektronendichtheid van de granula maar naar onze mening is dit een criterium dat moeilijker te hanteren is omdat de beoordeling van de graad van elektronendichtheid te subjectief gebeurt.

6.2.1. De A-cellen (fig. 39)

De A-cellen van poppen en pas ontloken vliegen bevatten reeds verspreide groepen neurosekretorische granula (fig. 40, 41, 42). De granula zijn bolvormig en hebben een diameter van ongeveer 1000 à 2500 Å (fig. 43). Er is een lichte stijging in het aantal granula te zien naarmate de vlieg ouder wordt (fig. 44). Vanaf het ogenblik dat eitjes afgelegd worden blijft dit aantal ongeveer konstant. In de graad van elektronendichtheid is wei-

nig verschil te merken tussen de verschillende granula in dezelfde cel. In de A-cellen verandert de graad van elektronendichtheid ook niet vanaf het popstadium tot het ogenblik dat rijpe eitjes afgelegd worden.

Het ER is meest uitgebreid in de marginale zone van de cel. Het is RER waarop de ribosomen zeer duidelijk te zien zijn (fig. 45). In het popstadium kunnen soms tot 8 paren naast elkaar gelegen lamellen gevonden worden (fig. 45). Gewoonlijk liggen er geen neurosekretorische granula tussen het ER in de marginale zone (fig. 45). Dieper in het perikaryon ligt het ER niet meer zo gelijnd, hoogstens 2 of 3 lamellen liggen nog gedeeltelijk naast elkaar (fig. 46). Gewoonlijk vindt men slechts korte cisternae van het ER tussen de neurosekretorische granula (fig. 43). Hoe meer granula aanwezig, hoe minder ER voorkomt (fig. 47). Ribosomen kunnen vrij in de cytoplasmatische matrix voorkomen, vooral in een zone rond de nucleus waar het ER weinig ontwikkeld is en waar de neurosekretorische granula ook niet voorkomen (fig. 43, 47).

Mitochondriën komen dikwijls gegroepeerd voor (fig. 43).

Golgi-systemen (fig. 42) worden in de A-cellen van wijffjes van 0 tot 3 uur oud in groot aantal aangetroffen. Zo werden eens ongeveer 20 Golgi-systemen per coupe geteld. Ze zijn van bijzonder belang voor de vorming van de neurosekretorische granula en zullen afzonderlijk behandeld worden in 6, 2, 4.

Zoals algemeen voorkomt in het dieren- en plantenrijk is de celkern omgeven door een dubbel membraan voorzien van poriën (fig. 40, 41). Vermits het dubbel kernmembraan gevormd is uit endoplasmatisch - reticulummembranen is het normaal dat ribosomen ook op het buitenste kernmembraan voorkomen (fig. 43, 47). De kerninhoud bevat diffuse chromatine - partikeltjes (fig. 47). De nucleolus is tamelijk groot, rond of ovaal en vrij elektronendicht (fig. 40).

A-cellen zijn te vergelijken met de MNC I-cellen of het macrogranulaire type van Bloch & al. bij Calliphora erythrocephala.

6.2.2. De A₁-cellen (fig. 48, 50)

De A₁ - cellen verschillen van de A-cellen door de afmetingen van de neurosekretorische granula, die 600 à 1400 Å bedragen (fig. 49). Bij volwassen vliegen is het aantal granula kleiner dan bij poppen (fig. 48, fig. 50). Bij poppen en jonge vliegen liggen de granula meer verspreid dan bij volwassen vliegen waar ze meer in afzonderlijke groepjes te vinden zijn (fig. 51).

In de A₁ - cellen liggen geen evenwijdig lopende cisternae van het ER in het cytoplasma ; het ER bestaat uit korte cisternae verspreid in het cytoplasma (fig. 53, 54).

De Golgi-systemen zijn in groot aantal aanwezig en kunnen bij volwassen vliegen grote afmetingen aannemen (fig. 52, 53). Opmerkenswaardig is ook het groot aantal mitochondriën en hun grote afmetingen bij de pop (fig. 51, 52, 53).

De A₁ - cellen zijn te vergelijken met de MNC II-cellen of het microgranulaire type van Bloch & al. bij Calliphora erythrocephala.

6.2.3. De B-cellen (fig. 55, 56)

De neurosekretorische granula komen in uiterst klein aantal voor. Ze liggen gegroepeerd en hebben een diameter van 400 à 1000 Å. Gewoonlijk treft men ook enkele granula van ongeveer 2000 Å aan (fig. 55, 56, 57).

Zoals bij de A₁ - cellen is het RER allesbehalve uitgebreid. Slechts sporadisch vindt men nog een membraan van het ER (fig. 55, 56).

Golgi-systemen komen zeer veel voor. Ze zijn gewoonlijk min of meer gebogen en zijn samengesteld uit een aantal smalle agranulaire cisternae (fig. 55, 57). Instulpingen van de celmembranen komen regelmatig voor bij de B-cellen (fig. 55). Volgens Smith & Treherne (1963) treft men deze instulpingen gewoonlijk aan bij grote zenuwcellen en niet bij kleine.

De B-cellen zijn te vergelijken met de "giant neurons," van Bloch & al. bij Calliphora erythrocephala.

6.2.4. Het_Golgi-systeem

De Golgi-systemen vertonen een typisch beeld in het cytoplasma. Zij zijn samengesteld uit een aantal dicht bij elkaar gelegen cisternae, waarvan het uitzicht zeer verschillend kan zijn naargelang de richting waarin ze doorgesneden werden. Het meest karakteristiek beeld heeft men als de cisternae zich voordoen als dubbele, evenwijdig lopende, vlakke of gewelfde membranen die een smalle intercisternale ruimte omsluiten (fig. 58, 59). Als de Golgi-systemen in een andere richting doorgesneden werden, zien ze er uit als een rij smalle ringen (fig. 48, 55).

Het verband tussen Golgi-systeem en neurosekretorische granula werd door volgende auteurs beschreven (E. Scharrer & Brown, 1961 ; Bern & al., 1961 ; Bern, 1962 ; Hagadorn & al., 1963) : E. Scharrer & Brown (1961) hebben aangetoond dat de neurosekretorische granula zonder twijfel aan de uiteinden van de Golgi-cisternae afgesnoerd worden in de NSC bij Lumbricus terrestris. Terzelfdertijd toonden zij aan dat het membraan rond de granula afkomstig is van het Golgi-membraan. Bij de koolvlieg hebben wij kunnen vaststellen dat elektronendicht materiaal in het sferisch gedeelte aan de uiteinden van de cisternae verzameld wordt om dan afgesnoerd te worden als een in een membraan ingesloten granulum (fig. 60). Zoals Scharrer & Brown (1961) en Normann (1965) hebben we elektronendicht materiaal kunnen aantonen in het tubulair gedeelte van de cisternae (fig. 60).

6.2.5. Karakterisatie_van_de_neurosekretorische_granula_van_de_A_en_A₁-cellen

6.2.5.1. Pronase-behandeling

Het hersenweefsel van de koolvlieg was dubbel gefixeerd en ingebed in ERL dat een epoxy-hars is zoals Epon. De werkwijze wordt beschreven in 2, 3, 6, 1. Zoals op fig. 61 te zien, werd een positieve reactie verkregen bij de A-cellen. De granula zijn ongeveer geheel of gedeeltelijk verteerd door het proteolytisch enzym pronase. Hiermee wordt dus de eiwitachtige aard van de neurosekretorische granula aangetoond.

De granula van A_1 -cellen van hetzelfde hersenweefsel als de hierboven vermelde A-cellen worden slechts weinig verteerd door het enzym (fig. 62). Dit wijst op een andere samenstelling van de granula van A_1 -cellen. Vermoed wordt dat mucopolysacchariden tot de mogelijke componenten zouden behoren (zie 6, 2, 5, 2).

6.2.5.2. Thiosemicarbazide-zilverproteïnaat-reaktie

De werkwijze volgens Thiéry (1967) die wij gebruikt hebben wordt vermeld in 2, 3, 6, 2. Thiosemicarbazide-behandeling gedurende 1, 2 of 3 dagen geeft een positieve reaktie zowel bij de A- als bij de A_1 -cellen (fig. 63, fig. 64). Tussen de A en A_1 -cellen is geen verschil in reaktie waargenomen. Soms is er een duidelijke concentratie van zilverproteïnaat in de membranen van de neurosekretorische granula (fig. 63), wat wijst op een hogere concentratie van mucopolysacchariden, waarschijnlijk gekomplexeerd met proteïnen.

Thiosemicarbazide-behandeling gedurende 30 minuten geeft slechts een zwakke reaktie (fig. 65, 66). Met deze methode werd dus aangetoond dat de granula in A- en A_1 -cellen bij de koolvlieg ofwel niet komplekse polysacchariden ofwel mucopolysacchariden bevatten. Met de alcian-blauw-kleuring (5,4) werd reeds aangetoond dat deze polysacchariden geen zure groepen bevatten.

6.3. Samenvatting

In het elektronenmikroskopisch onderzoek van de MNSC bij de koolvlieg werden volgende kenmerken bij de A-, A_1 - en B-cellen opgemerkt :

A-cel : gekenmerkt door aanwezigheid van bolvormige granula met een diameter die schommelt tussen de 1000 en 2500 Å.

Het ER is vooral bij poppen of jonge vliegen zeer goed ontwikkeld in de marginale zone van de NSC.

Golgi-systemen worden in groot aantal aangetroffen bij wijfjes van 0 tot 3 uur oud.

A₁-cel : gekenmerkt door de aanwezigheid van granula met een diameter die schommelt tussen de 600 en 1400 Å. Het ER is te zien als korte cisternae verspreid in het cytoplasma.

De grote afmetingen van de Golgi-systemen bij volwassen vliegen en deze van de mitochondriën bij poppen zijn opvallend en wijzen op een hoog metabolisme.

B-cel : gekenmerkt door zeer minieme hoeveelheden gegroepeerde granula met een diameter die schommelt tussen de 400 en 1000 Å ; hiertussen treft men soms enkele granula met een diameter van 2000 Å aan.

Het ER is slechts sporadisch te zien.

Het aantal Golgi-systemen is groot.

Instulpingen van het celmembraan komen regelmatig voor.

Bij de koolvlieg werd een accumulatie van elektronendicht materiaal in het tubulair gedeelte van de cisternae van het Golgi-systeem waargenomen, alsook de afsnoering van granula aan de uiteinden van de cisternae.

Met een pronase-behandeling toont men de eiwitachtige aard van de neurosekretorische granula aan. De aanwezigheid van niet komplekse polysacchariden, ofwel mucopolysacchariden, waarschijnlijk gekomplexeerd met proteïnen, wordt met behulp van de thiosemicarbazide-zilverproteïnaat-reaktie duidelijk gemaakt.

DISKUSSIE

Voor het vaststellen van de fysiologische ouderdom bij wijfjes van insekten blijkt de beoordeling van de ontwikkelingsgraad van de ovaria een betrouwbare parameter te zijn. De methode van Highnam (1961, 1962), Mordue (1965 a, b) en Lea (1967) bestaande in het meten van de lengte van de terminale oöcyt vraagt meer tijd en geeft geen betrouwbaardere resultaten.

De meeste auteurs gebruiken Bouin als fixatiemiddel, maar het uitspoelen van picrinezuur duurt vrij lang. Te veel picrinezuur in het weefsel geeft geen duidelijke blauwkleuring met PAF. Susa wordt als het beste fixatiemiddel voor het histologisch onderzoek van de koolvlieg en voor de PAF-kleuring bevonden. Alleen Schooneveld (1970) verkiest Susa als het best passend fixatief voor de Coloradokever. Susa is ook bruikbaar als fixatiemiddel voor de fluorescentiemikroskopie omdat het formol bevat, dat een noodzakelijke komponent is voor het fixatief om fluorescentie te verkrijgen.

Om de groene kleur in het weefsel te krijgen tijdens de tegenkleuring volgens Halmi, wordt de oorspronkelijke methode licht gemodificeerd. Een tweede kleuroplossing wordt gemaakt (identisch aan de voorgeschreven oplossing), maar de hoeveelheid light-green kleurstof wordt 4 maal zo hoog genomen. Bij de Coloradokever (mondelinge mededeling Schooneveld), wordt dit eveneens zo uitgevoerd, maar met een voorafgaande inwerking van een beitsmiddel. Dit schijnt evenwel niet nodig bij de koolvlieg.

Merkwaardig is het negatief resultaat bij de koolvlieg met de CHP-kleuring. Tot nu toe zijn we er nog niet in geslaagd de oorzaak van dit falen op te sporen. Het is echter vrij algemeen gekend dat bepaalde kleuringen automatisch geen resultaten geven bij alle insekten. Voorbeelden hiervan zijn het falen van de PAF-kleuring bij Iphita limbata (Nayar, 1955), terwijl dezelfde kleuring bij Hydrous piceus het neurosekreet kleurt, hoewel het nog phoxinofiel is (De Lerma, 1956).

Met de in situ kleuring van de hersenen is het mogelijk twee groepen MNSC te onderscheiden die symmetrisch gelegen zijn t.o.v. de medio-dorsaal lijn. Met de klassieke histologische methoden (fixeren, inbedden, snijden, kleuren) is dit nooit duidelijk zichtbaar. Dit is waar-

schijnlijk de verklaring voor het feit dat men gewoonlijk spreekt van de aanwezigheid in het pars intercerebralis van 2 groepen NSC die versmolten zijn. Met de in situ methode kan men tevens de ligging van de A₁-cellen situeren, tevens steunend op de ligging van deze NSC in coupes. Op te merken valt dat deze methode niet veel toepassing kent alhoewel ze zeer geschikt is om de ligging van de NSC in de hersenen zonder het maken van coupes, te bepalen.

Bij ons weten, is in onze studie voor de eerste maal met succes ERL als inbeddingsmedium voor elektronenmikroskopisch onderzoek van het hersenweefsel van insekten gebruikt. ERL kan in sommige weefsels niet polymeriseren. Dit is bijvoorbeeld het geval voor dooier bevattende oöcyten van de Coloradokever; met Epon wordt de dooier wel goed ingebed (mondelinge mededeling De Loof). De 2 grote voordelen van ERL zijn de gemakkelijke hanteerbaarheid en de mogelijkheid om heel het pars intercerebralis in één coupe te snijden. Een nadeel is echter de noodzakelijkheid om de klassieke dubbelkleuring uranylacetaat - loodcitraat te vervangen. Hiervoor hebben we een nieuwe dubbelkleuring met kaliumpermanganaat en loodcitraat op punt gesteld. Deze kleuring geeft een goed contrast en vraagt een veel kortere kleuringstijd. De uranylacetaat - loodcitraat kleuring duurt ongeveer één uur, terwijl 8 minuten volstaan voor de nieuwe methode. Hierdoor wordt het risico, een ongewenste neerslag van loodcarbonaat tijdens de kleuring te krijgen, ook veel kleiner.

De 3 celtypen die tijdens het optisch histologisch onderzoek kunnen onderscheiden worden, hebben wij tijdens het elektronenmikroskopisch onderzoek kunnen terugvinden; de typering kon behouden worden. Er wordt door M. Thomsen (1965) geen verschil gevonden (lichtmikroskopisch) tussen de MNSC van Calliphora erythrocephala, terwijl Bloch & al. (1966) wel 2 typen NSC vaststellen bij hetzelfde insekt. Bij zeer weinig insekten kan een verband gelegd worden tussen het optisch histologisch en het elektronenmikroskopisch onderzoek van de NSC.

Bij de A- en B - cellen menen we in sommige gevallen dat er nog een verder onderscheid kan gemaakt worden. Bij oude wijfjes die geen eitjes konden afleggen (gebrek aan parings- en ovipositiemogelijkheid), bemerken wij een aantal zeer donker purpere A-cellen terwijl de andere

A-cellen purper-oranje gekleurd zijn. Dezelfde NSC hebben wij met de elektronenmikroskoop onderzocht maar wij hebben geen verschil kunnen opmerken. Of dit nu alleen in verband staat met de hoeveelheden granula of met de samenstelling er van, kan niet uitgemaakt worden. Typisch zijn wel de grote hoeveelheden granula t.o.v. de NSC van normale eileggende wijfjes. Voor wat de B-cellen betreft hebben we met de histologische kleuring de indruk dat sommige cellen bleekgroen en andere bruingroen gekleurd zijn. Met de elektronenmikroskoop hebben we geen verschil tussen deze cellen kunnen vaststellen. Het is ons echter wel opgevallen dat bij sommige B-cellen het kernmembraan zeer onregelmatig is en bij andere regelmatig. Structuurverschillen op subcellulair niveau worden niet opgemerkt, alhoewel dit niet uitsluit dat er toch verschillen kunnen zijn in de samenstelling van de granula. Het feit, dat eenzelfde celtype zowel histologisch als elektronenmikroskopisch gekarakteriseerd wordt, laat toe vast te stellen dat 1) de granula van de A₁-cellen, die de kleinste diameter bezitten, ook de kleinste agglomeraten vormen bij het optisch histologisch onderzoek. 2) de A-cellen, waarvan de granula een grotere diameter hebben, de grootste agglomeraten vormen. Hiermee wordt aangetoond dat de opvatting (M. Thomsen, 1965) dat de kleinste agglomeraten na PAF-kleuring de grootste granula voorstellen niet opgaat voor de koolvlieg.

Het aantal MNSC bij de koolvlieg is van dezelfde grootte orde als bij andere tot nog toe onderzochte Diptera.

Het verband leggen tussen structuur en functie van NSC bij insecten is bijzonder moeilijk. Aangezien het in ons geval alleen om een beschrijvende studie gaat is het nog te vroeg voor hypotesen over de eventuele rol van de verschillende NSC en hun sekreet. Er wordt wel een poging gedaan om bij de vier onderzochte ontwikkelingsstadia een verband te leggen tussen structuur van de NSC en de ontwikkelingsgraad van de ovariolen, maar een duidelijke korrelatie kan niet vastgesteld worden. Dit is te wijten aan het feit dat het neurosekretorisch systeem gedurende de eirijping actief is en er gedurende heel die periode maar weinig kleurbaar materiaal in de NSC aanwezig is. Volgende auteurs hebben grote hoeveelheden neurosekretorisch materiaal gevonden gedurende de inaktiviteit van de ovaria (geen dooierafzetting) en wei-

nig gedurende de eirijping : Highnam (1962 a, b) en Highnam & Lusi (1962) bij Schistocerca ; Highnam & Haskell (1964) en Cassier (1965 a, b) bij Locusta ; Mordue (1965) bij Tenebrio ; Bloch & al. (1966) bij Calliphora ; Strambi (1967) bij Polistes spec. Bij Schistocerca, Locusta en Tenebrio kan de eirijping geïnduceerd worden en vanaf dat ogenblik vermindert de hoeveelheid neurosekreet zeer sterk (Highnam 1961 a, 1962 a, b ; Highnam & Lusi, 1962 ; Highnam & Haskell, 1964). Bij de kever Hypera postica zijn de NSC gedurende de voortplantingsperioden meer gevuld met neurosekretorisch materiaal dan gedurende de diapauze (Tombes & Bodenstein, 1967).

De beoordeling van de aktiviteit van een NSC is een zeer kompleks probleem : de hoeveelheid sekreet op een bepaald ogenblik in een NSC is altijd de resultante van synthese en afgifte ; het vaststellen van de aanwezigheid van veel of weinig sekreet alleen is onvoldoende. Men moet een type NSC volgen gedurende een hele ontwikkelingsperiode van het insekt omdat het mogelijk is dat een bepaalde NSC nooit een grote hoeveelheid sekreet accumuleert. Als én synthese én afgifte snel verlopen kan de NSC er leeg uitzien. Als de synthese sneller verloopt dan de afgifte zal er accumulatie zijn, maar dit betekent op zichzelf nog niet dat die cel niet aktief zal zijn. Zelfs met autoradiografische experimenten (inspuiten van ³⁵S-cysteïne), een methode die vanzelfsprekend doelmatiger is dan de gewone kleuringsmethode, kan men nog geen exakte indruk krijgen van snelheid van synthese.

De konzentratie van het hormoon in de granula kent men niet evenmin als de minimum hoeveelheid hormoon om een bepaald fysiologisch proces in gang te steken en aan de gang te houden. NSC met granula, waarin een bepaald hormoon slechts in lage konzentratie voorkomt, zullen dus meer granula moeten synthetiseren en afgeven dan andere NSC waarvan de granula een hoge konzentratie aan hormoon bevatten, tenminste als men als werkhypothese aanneemt dat evenveel hormoonmoleculen nodig zijn voor de regulatie van twee vergelijkbare, fysiologische processen hetgeen niet noodzakelijkerwijze het geval moet zijn.

Volgens ons is het vaststellen van de graad van aktiviteit van een NSC uiterst moeilijk. Het is heel goed mogelijk dat men per insekt de NSC, type per type, moet beschouwen. Bij de koolvlieg hebben we bij de B-cellen nooit een grote hoeveelheid granula gezien. Wijst dit nu

op een grote of kleine synthesesnelheid en een grote of kleine afgifte snelheid, of is de hormoonconcentratie altijd zeer hoog waardoor er dan weinig granula zullen gevormd worden? Men kan moeilijk aannemen dat een NSC altijd even actief is. Bij deze B-cellen hebben we wel gezien dat het kernmembraan ofwel onregelmatig ofwel regelmatig gebogen is. Of dit in verband staat met de snelheid van synthese van RNA in de kern valt niet te bewijzen. Het is vanzelfsprekend dat voor de synthese van eiwitachtige granula zowel endoplasmatisch reticulum en Golgi-systemen goed ontwikkeld moeten zijn en dat er ook een behoorlijk aantal mitochondriën nodig zijn voor de energie voorziening. Absolute kwantitatieve criteria zullen echter niet kunnen opgesteld worden zolang de verschillende hersenhormonen niet beter gekarakteriseerd zijn.

De laterale cellen, de NSC aan de ooglob en de NSC in het suboesophageaal ganglion worden na karakterisatie met optisch histologische methoden B-cellen genoemd, omdat ze op dezelfde manier reageren als de B-cellen van het pars intercerebralis. Een voorlopig onderzoek van de laterale cellen en de NSC van de ooglob met de elektronenmikroskoop hebben echter aangetoond dat deze cellen helemaal niet te vergelijken zijn met de B-cellen van het pars intercerebralis. Ze kunnen evenveel of meer granula bevatten dan de A en A₁-cellen; de diameter van de granula van de laterale cellen is minstens even groot als deze van de A₁-cellen. Verder onderzoek zou deze resultaten nog moeten bevestigen.

Reeds heel wat histochemische studies werden uitgevoerd op de NSC van verschillende insecten om de chemische samenstelling van het neurosekreet te bepalen: Rehm (1955) toonde een fosfo-lipoproteïne complex aan bij Ephestia kühniella Zel, Galleria mellonella L. en Pieris brassicae L.; Nayar (1955) een fosfolipide en een proteïne bij Iphita limbata; Kobayashi (1957) een lipide en een fosfolipide bij Bombyx mori; Ganguly & Basu (1962) een mucopolysaccharide of een mucoproteïne bij Bombyx mori; Brousse & al. (1958) en Ramade (1969) een sulfydrylrijk lipoproteïne bij Blabera fusca en Musca domestica; Fraser (1959 a, b) een mucopolysaccharide, een glycolipide, een fosfolipide en een lipoproteïne bij Lucilia caesar; Girardie & Girardie (1967) een glycoproteïne bij Locusta migratoria; Pipa (1962) een lipofuchsine bij

Periplaneta americana ; Arvy & Gabe (1962) een sulfydrylrijk glyco-proteïne bij een 15-tal insekten van 9 verschillende orden ; Schreiner (1966) en Naisse (1966) een sulfydrylrijk proteïne bij Oncopeltus fasciatus en Lampyris noctiluca.

Bij de koolvlieg hebben we met een Alcian-blauwkleuring en een pronase behandeling kunnen aantonen dat het neurosekreet uit S-S-bruggen en (of) -SH groepen en meer algemeen uit proteïne samengesteld is. De aanwezigheid van niet komplexe polysacchariden of van mucopolysacchariden, waarschijnlijk met proteïnen gekomplexeerd, wordt met behulp van de thiosemicarbazide-zilverproteïnaat-reaktie aangetoond.

Hersenhormonen zijn evenals de granula van eiwitachtige aard, maar hieruit mag nog niet besloten worden dat de granula de hormonen zelf voorstellen of dat ze de draagstof van de hormonen zijn of getransformeerd worden in hormonen.

LITERATUUROPGAVE

- ADAM H. 1960. Hypophyse und hypothalamo-neurohypophysäres Neurosekretsystem bei den Cyclostomen Myxine glutinosa und Bdellostoma stou-ti.
Zool. Anz. 23, Suppl. 157-171.
- ADAMS T.S. 1970. Ovarian regulation of the corpus allatum in the housefly, Musca domestica.
J. Insect. Physiol., 16, 349-360.
- ALBRECHT F.O. 1953. The anatomy of the migratory locust.
Athlone Press, London.
- ALDRIDGE W.G. & M.L. WATSON. 1963. Perchloric acid extraction as a histochemical technique.
J. Histochem. Cytochem. 11, 773-781.
- ARVY L. & M. GABE. 1952. Données histophysiologiques sur les formations endocrines rétro-cérébrales de quelques Odonates.
Ann. Sci. Natur. Zool. 14, 345-374.
- ARVY L. & M. GABE. 1953. Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez les Paléoptères (Ephéméroptères et Odonates).
Z. Zellforsch. 38, 591-610.
- ARVY L. & M. GABE. 1962. Histochemistry of the neurosecretory products of the pars intercerebralis of pterygote insects.
Mem. Soc. Endocr. 12, 349-369.
- BERN H.A. 1962. The properties of neurosecretory cells.
Gen. comp. Endocrinol, Suppl. 1, 117-131.
- BERN H.A., R.S. NISHIOKA & I.R. HAGADORN. 1961. Association of elementary neurosecretory granules with the Golgi complex.
J. Ultrastruct. Res. 5, 311-320.
- BLOCH B., E. THOMSEN & M. THOMSEN. 1966. The neurosecretory system of the adult Calliphora erythrocephala III Electron microscopy of the medial neurosecretory cells of the brain and some adjacent cells.
Z. Zellforsch. 70, 185-208.
- BONNER WEIR S. 1970. Control of moulting in an insect. More than an activated prothoracic gland seems to be necessary in an insect (Calpodethlius).
Nature 228, 580-581.
- BOYDE A. & C. WOOD. 1969. Preparation of animal tissues for surface scanning electron microscopy.
J. Microscopy 90, 221-249.
- BOWERS W.S. & S. FRIEDMAN. 1963. Mobilisation of fat body glycogen by an extract of corpus cardiacum.
Nature 198, 685.
- BROUSSE P., S. IDELMAN & D. ZAGURY. 1958. Mise en évidence de lipoprotéines à groupement-SH au niveau des grains sécrétion cellules neurosécrétrices de la Blatte, Blattella fusca Br.
C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 246, 3106-3108.

- BURGESS L. 1971. Neurosecretory cells and their axon pathways in Culiseta inornata (Williston) (Diptera: Culicidae).
Can. J. Zool. 49, 889-901.
- BUTENANDT A. & P. KARLSON. 1954. Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form.
Z. naturf. 9 b, 389-391.
- CAMERON M.L. & J.E. STEELE. 1959. Simplified Aldehyde-fuchsin staining of Neurosecretory Cells.
Stain Techn. 34, 265-266.
- CASSIER P. 1965 a. Interactions des effets du groupement et d'un facteur saisonnier chez Locusta migratoria migratorioides (R. & F.).
Bull. Soc. Zool. Fr. 90, 39-51.
- CASSIER P. 1965 b. Contribution à l'étude du comportement phototrope du criquet migrateur (Locusta migratoria migratorioides R. et F.).
Ann. Sci. Nat., Zool. Sér. 12, 7, 213-358.
- CASSIER P. & M.A. Fain-Maurel. 1970 a. Contribution à l'étude infra-structurale du système neurosécréteur rétro-cérébral chez Locusta migratoria migratorioides (R. et F.). I. Les corpora cardiaca.
Z. Zellforsch. 111, 471-482.
- CASSIER P. & M.A. Fain-Maurel. 1970 b. Contribution à l'étude infra-structurale du système neurosécréteur rétro-cérébral chez Locusta migratoria migratorioides (R. et F.). II. Le transit des neurosécrétions.
Z. Zellforsch. 111, 483-492.
- CAZAL P. 1948 a. Les glandes endocrines rétro-cérébrales des insectes.
Bull. biol. France Belg., 32, 1-227.
- CAZAL P. 1948 b. Les glandes endocrines rétro-cérébrales des insectes
Bull. biol. France Belg., Suppl. 33, 9-18.
- CHAPMAN R.F. 1969. The Insects. Structure and Function. The English Universities Press.
819 pp.
- CLIFT A.D. 1971. Control of germinal activity and yolk deposition in nonterminal oöcytes of Lucilia cuprina.
J. Insect Physiol. 17, 601-606.
- COALSON R.E. 1966. Pseudoisocyanin staining of insulin and specificity of empirical islets cell stains.
Stain Technol. 41, 121-129.
- CROSSWHITE C.D. & J.T. MEDLER 1966. Morphology and Histology of the Neuroendocrine System of Bombus fervidus Fabricius (Hymenoptera: Apidae).
Can. Ent. 98, 1329-1337.
- DE LERMA B. 1956. Corpora cardiaca et neurosécrétion protocérébrale chez le Coléoptère Hydrous piceus L.
Ann. Sci. Nat. Zool. (11). 18, 235-250.

- DE LOOF A. 1969. Causale mechanismen bij de vitellogenese van de Coloradekever, Leptinotarsa decemlineata Say.
Proefschrift, Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen, Gent.
- DE LOOF A. 1969. Hormonal Control of the Synthesis of an Important Vitellogenic Hemolymph Protein in the Colorado Beetle, Leptinotarsa decemlineata Say.
Gen. Comp. Endocrinol. 13, Abstract n° 92.
- DE LOOF A. & J. de WILDE. 1970. Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado Beetle, Leptinotarsa decemlineata Say.
J. Insect Physiol. 16, 1455-1466.
- de WILDE J. 1953. Provisional analysis of the imaginal diapause in an insect. (Leptinotarsa decemlineata Say).
Acta Physiol. Pharm. 3, 133.
- de WILDE J. 1955. The significance of the photoperiod for the occurrence of diapause in the adult Leptinotarsa decemlineata Say.
Proceedings First International Photobiological Congress.
- de WILDE J. 1960. Diapause in the adult Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say) as an endocrine deficiency syndrome of the corpora allata. The Ontogeny of Insects (Acta symposiï de evolutione insectorum, Praha 1959) 226-230.
- de WILDE J. & J.A. DE BOER. 1960. Physiology of diapause in the adult Colorado beetle. II Diapause as a case of pseudo-allatectomy.
J. Insect Physiol. 6, 152-161.
- de WILDE J. & J.A. DE BOER. 1969. Humoral and nervous pathways in photoperiodic induction of diapause in Leptinotarsa decemlineata.
J. Insect Physiol. 15, 661-675.
- de WILDE J., C.S. DUINTJER & L. MOOK. 1959. Physiology of diapause in the adult Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say). I. The photoperiod as a controlling factor.
J. Insect Physiol. 3, 75-85.
- de WILDE J. & D. STEGWEE. 1958. Two major effects of the corpus allatum in the adult Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say).
Arch. Neerl. Zool. 13, Suppl. 277-289.
- DOGRA G.S. & B.K. TANDAN. 1964. Adaptation of certain histological techniques for in situ demonstration of the neuroendocrine system of insects and other animals.
Quart. J. Micr. Sci., 105, 455-466.
- ENGELMANN F. 1962. Further Experiments on the Regulation of the Sexual Cycle in Females of Leucophaea maderae (Blattaria).
Gen. Comp. Endocrinol. 2, 183-192.
- ENGELMANN F. 1970. Reproduction in insects. Pergamon Press.
307 pp.
- FAHIMI N.D. & P. DROCHMANS. 1965. Essais de standardisation de la fixation au glutaraldehyde. II Influence des concentrations en aldehyde et de l'osmolalité.
J. Microscopie, 4, 737-748.

- FLETCHER B.S. 1969. The diversity of cell types in the neurosecretory system of the beetle Blaps mucronata.
J. Insect Physiol., 15, 119-134.
- FRAENKEL G. & C. HSIAO. 1965. Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects.
J. Insect Physiol., 11, 513-556.
- FRASER A. 1959 a. Neurosecretion in the brain of the larvae of the sheep blow fly, Lucilia caesar (Diptera).
Quart. J. Micr. Sci. 100, 377-394.
- FRASER A. 1959 b. Neurosecretory cells in the abdominal ganglia of larvae of Lucilia caesar (Diptera).
Quart. J. Micr. Sci. 100, 395-399.
- FÜLLER H.B. 1960. Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die neurosekretorischen Verhältnisse im Zentralnervensystem von Blattiden und Culiciden.
Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. 69, 224-250.
- GABE M. 1953. Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldehyde.
Bull. Microsc. appl. (2) 3, 153-162.
- GABE M. 1954. La neuro-sécrétion chez les invertébrés.
Ann. Biol. 30, 6-62.
- GABE M. 1966. Neurosecretion.
Pergamon Press. 872 blz.
- GANGULY B.N. & B.D. BASU. 1962. Studies on some chemical contents of the neurosecretory cells of adult silk worm, Bombyx mori L.
Acta histochem. 13, 31-47.
- GERSCH M. 1970. Generelle Probleme der Neuroendokrinologie Wirbelloser Tiere.
Biol. Rundschau 8, 77-90.
- GERSCH M., K. RICHTER, G.A. BÖHM & J. STÜRZEBECKER. 1970. Selektive Ausschüttung von Neurohormonen nach elektrischer Reizung der Cor-pora cardiaca von Periplaneta americana in vitro.
J. Insect Physiol., 16, 1991-2013.
- GILLOTT C. 1969. Morphology and histology of the cephalic endocrine glands of the damselfly, Coenagrion angulatum Walker (Zygoptera: Odonata).
Can. J. Zool. 47, 1187-1192.
- GIRARDIE A. & J. GIRARDIE. 1967. Etude histologique, histochemique et ultrastructurale de la pars intercerebralis chez Locusta migratoria L. (Orthoptère). Z. Zellforsch. 78, 54-75.
- GOLDSWORTHY G.J. 1970. The action of hyperglycaemic factors from the corpus cardiacum of Locusta migratoria on glycogen phosphorylase.
Gen. Comp. Endocrinol. 14, 360-369.
- GOLDSWORTHY G.J. & N. MORDUE. 1971. Adipokinetic hormones in insects.
6 th Congr. Eur. Comp. Endocrinol. Montpellier.
- GOMORI G. 1939. A differential stain for cell types in the pancreatic islets.
Am. J. Path. 15, 497-499.

- GOMORI G. 1941. Observations with differential stains on human islets of Langerhans.
Amer. J. Pathol. 17, 395-406.
- GOMORI G. 1950. Aldehyde-fuchsin. A new stain for elastic tissue.
Amer. J. Clin. Pathol. 20, 665-668.
- GOSBEE J.L., J.V. MILLIGAN & B.N. SMALLMAN. 1968. Neural properties of the protocerebral neurosecretory cells of the adult cockroach Periplaneta americana.
J. Insect. Physiol. 14, 1785-1792.
- GROTH U. 1971. Vergleichende Untersuchungen über die Topographie und Histologie des Gehirns der Dipteren.
Zool. Jb. Anat. Bd. 88, 203-319.
- HAGADORN I.R., H.A. BERN & R.S. NISHIOKA. 1963. The fine structure of the supraoesophageal ganglion of the rhynchobdellid leech, Theromyzon rude, with special reference to neurosecretion.
Z. Zellforsch. 58, 714-758.
- HALMI N.S. 1952. Differentiation of two types of basophils in the adenohypophysis of the rat and the mouse.
Stain Technol. 27, 61-64.
- HANSTRÖM B. 1938. Zwei Probleme betreffs des hormonalen Lokalisation im Insektenkopf.
K. fysiogr. Sällsk. Lund Handl., 49, 3-17.
- HANSTRÖM B. 1940. Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordnungen.
K. svenska Vet. - Akad. Handl., Ser III, 18 (8), 1-266.
- HARKER J.E. 1960. Internal factors controlling the suboesophageal ganglion neurosecretory cycle in Periplaneta americana L.
J. exp. Biol. 37, 164-170.
- HAYAT M.A. 1970. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Vol. I 412 p.
Van Nostrand Reinhold Company.
- HERRMANN H. 1969. Die Neurohormonale Kontrolle der Paarungsflüge und der Eilegetätigkeit bei der Bienenkönigin.
Zeitschr. Bienenforsch. 9, 509-544.
- HIGHNAM K.C. 1961. The histology of the neurosecretory system of the adult female desert locust, Schistocerca gregaria.
Quart. J. micr. Sci. 102, (1) : 27-38.
- HIGHNAM K.C. 1961 a. Induced changes in the amounts of material in the neurosecretory system of the desert locust.
Nature 191, 199-200.
- HIGHNAM K.C. 1962. Neurosecretory control of ovarian development in the desert locust.
Neurosecretion. Mem. soc. Endocr., 12, 379-390.
- HIGHNAM K.C. 1962 a. Neurosecretory control of ovarian development in Schistocerca gregaria.
Quart. J. Microscop. Sci. 103, 57-72.

- HIGHNAM K.C. 1962 b. Neurosecretory control of ovarian development in the desert locust.
Mem. Soc. Endocrinol. 12, 379-390.
- HIGHNAM K.C. & P.T. HASKELL. 1964. The endocrine systems of isolated and crowded Locusta and Schistocerca in relation to oocyte growth, and the effects of flying upon maturation.
J. Insect Physiol. 10, 849-864.
- HIGHNAM K.C. & L. HILL. 1969. The comparative endocrinology of the invertebrates. 270 pp.
Edw. Arnold, London.
- HIGHNAM K.C. & O. LUSIS 1962. The influence of nature males on the neurosecretory control of ovarian development in the desert locust.
Quart. J. Micr. Sci. 103, 73-83.
- HSIAO C. & G. FRAENKEL 1966. Neurosecretory Cells in the Central Nervous System of the Adult Blowfly Phormia regina Meigen. (Diptera: Calliphoridae).
J. Morph., 119, 21-38.
- JENKIN P.M. 1970. Control of Growth and Metamorphosis. International Series of Monographs in Pure and Applied Biology.
Zoology Division Vol. 47 383 pp.
- JOBSEN J.A. 1966. The action of ethylene-urea, as a chemosterilant on Musca domestica L. and the anatomical and histological examination of the normal and ethylene-urea damaged process of oogenesis in Musca domestica L. Report on entomological res. at Woodstock Agric. Res. Centre.
- JOHANSSON A.S. 1958. Relation of nutrition to endocrine-reproductive functions in the milkweed bug Oncopeltus fasciatus (Dallas) (Heteroptera : Lygaeidae).
Nytt Mag. Zool. 7, 1-132.
- JOHANSON B. 1963. A histological study of neurosecretion in aphids.
J. Insect Physiol. 9, 727-739.
- JOLY P. 1968. Endocrinologie des Insectes.
Masson et Cie, Paris 344 pp.
- KING D.S. & J.B. SIDDALL. 1969. Conversion of α -Ecdysone to β -Ecdysone by Crustaceans and Insects.
Nature 221, 955-956.
- KING R.C. & S.K. AGGARWAL. 1965. Oogenesis in Hyalophora cecropia.
Growth, 29, 17-83.
- KÖPF H. 1957. Über Neurosekretion bei Drosophila. I. Zur Topographie und Morphologie neurosekretorischer Zentren bei der Imago von Drosophila.
Biol. Zbl. 76, 28-42.
- KOBAYASHI M. 1957. Studies on the neurosecretion in the silkworm, Bombyx mori L.
Bull. seric. Exp. Stn Japan 15, 181-273.
- LEA A.O. 1967. The medial neurosecretory cells and egg maturation in mosquitoes.
J. Insect Physiol. 13, 419-429.

- LEA A.O. & E. THOMSEN. 1962. Cycles in the synthetic activity of the medial neurosecretory cells of Calliphora erythrocephala and their regulation.
Neurosecretion. Mem. Soc. Endocr. 12, 345-346.
- LEA A.O. & E. THOMSEN. 1969. Size independent secretion by the corpus allatum of Calliphora erythrocephala.
J. Insect Physiol., 15, 477-482.
- LEV R. & S.S. SPICER. 1964. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH.
J. Histochem. Cytochem. 12, 309.
- LILLIE R.D. 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry 501 pp.
The Blakiston Company. New York, Toronto. 1964. 3^{de} ed.
- LYONNETT P. 1762. Traité anatomique de la chenille qui ronge la bois du saule.
La Haye.
- MADDRELL S.H.P. 1962. A diuretic hormone in Rhodnius prolixus Stål.
Nature, Lond. 194, 605-606.
- MAYER R.J. & D.J. CANDY. 1969. Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca.
J. Insect Physiol. 15, 611-620.
- MEYER A.S., E. HANZMANN, H.A. SCHNEIDERMAN, L.I. GILBERT & N. BOYETTE. 1970. The isolation and identification of the two juvenile hormones from the Cecropia moth.
Arch. Biochem. Biophys. 137, 190-213.
- MOENS M. 1972. Invloed van γ - stralen op de vrouwelijke geslachtsorganen van de koolvlieg Delia brassicae Bouché.
Verhandeling tot het verkrijgen van de graad van landbouwkundig ingenieur (in voorbereiding).
- MONNERON A. & W. BERNHARD. 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en epon.
J. Microscopie 5, 697-714.
- MORDUE W. 1965. Studies on oöcyte production and associated histological changes in the neuro-endocrine system in Tenebrio molitor L.
J. Insect Physiol. 11, 493-503.
- MORDUE W. & G.J. GOLDSWORTHY. 1969. The physiological effects of corpus cardiacum extracts in Locusts.
Gen. comp. Endocrinol. 12, 306-369.
- MORIYAMA H., K. NAKANISCHI, D.S. KING, T. OKAUCHI, J.B. SIDDAL & W. HAFFERL. 1970. On the origin and metabolic fate of α - ecdysone in insects.
Gen. Comp. Endocrinol 15, 80-87.
- NABERT A. 1913. Die Corpora allata der Insekten.
Z. wiss. Zool, 104.
- NAISSE J. 1966. Contrôle endocrinien de la différenciation sexuelle chez Lampyrus noctiluca (Coléoptère Lampyride). II: Phénomènes neurosécrétoires et endocrines au cours du développement postembryonnaire chez le mâle et la femelle.
Gen. comp. Endocrinol. 7, 85-104.

- NAYAR K.K. 1955. Studies on the neurosecretory system of Iphita limbata Stal. I. Distribution and structure of the neurosecretory cells of the nerve ring.
Biol. Bull. Wood's Hole 108, 296-307.
- NISHIITSUTSUJI-UWO J. 1960. Fine structure of the neurosecretory system in Lepidoptera.
Nature (Lond.) 118, 953-954.
- NISHIITSUTSUJI-UWO J. 1961. Electron microscopic studies on the neurosecretory system in Lepidoptera.
Z. Zellforsch. 54, 613-630.
- NIXON W.C. 1969. Scanning Electron Microscopy.
Contemp. Phys., 10, 71-96.
- NOIROT CH., C. NOIROT-THIMOTHEE & J. DELACHAMBRE. 1967. Etude comparative de quelques techniques histochemiques en microscopie électronique : application à la cuticule des insectes.
Colloque Soc. Française et Soc. Belge Microscopie Electronique, Bruxelles, mai 1967.
J. Microscopie, 6, 73 a.
- NORMANN T.C. 1965. The neurosecretory system of the adult Calliphora erythrocephala. I. The fine structure of the corpus cardiacum, with some observations on adjacent organs.
Z. Zellforsch. 67, 461-501.
- NORMANN T.C. & H. DUVE. 1969. Experimentally induced release of a neurohormone influencing hemolymph trehalose level in Calliphora erythrocephala (Diptera).
Gen. comp. Endocrinol. 12, 449-459.
- NOVAK V.J.A. 1966. Insect Hormones.
Methuen, London 478 pp.
- PEASE D.C. 1964. Histological Techniques for Electron Microscopy.
38/p : 2 ed.
Academic Press. New York & London.
- PIPA R.L. 1962. A cytochemical study of neurosecretory and other neuroplasmic inclusions in Periplaneta americana.
Gen. comp. Endocrinol. 2, 44-52.
- POSSOMPES B. 1953. Recherches expérimentales sur le déterminisme de la métamorphose de Calliphora erythrocephala Meig.
Arch. Zool. exp. et gén., 89 : 203-364.
- RAMADE F. 1969. Données histologiques, histochemiques et ultrastructurales sur la pars intercerebralis de Musca domestica L.
Mém. mus. natn. Hist. nat., Paris 58, 113-142.
- REHM M. 1955. Morphologische und histochemische Untersuchungen an Neurosekretorischer Zellen, von Schmetterlingen.
Z. Zellforsch. 42, 19-58.
- REYNOLDS E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol., 17, 208-212.

- ROBERTSON J.D., M.D.T.S. BODENHEIMER & D.E. STAGE. 1963. The Ultra-structure of Mauthner Cell Synapses and Nodes in Goldfish Brains. *J. Cell Biol.* 19, 159-199.
- RÖLLER H., K.H. DAHM, B.M. TROST & C.C. SWEELY. 1967. Scientists isolate juvenile hormone. The hormone which controls insect growth and development does not have sesquiterpenoid structure previously predicted. *Chem. Eng. News* 45 (nr. 16) 48-49.
- RÖLLER H. & K.H. DAHM. 1970. The identity of juvenile hormone produced by *corpora allata* in vitro. *Naturwissenschaften* 57, 454-455.
- ROMEIS B. 1968. *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg, Wenen, 757 pp.
- ROMER F. 1971. Häutungshormone in den Oenocyten des Mehlkäfers. *Die Naturwissenschaften* 58, Heft 6, 324-325.
- ROSA F. & F.B. JOHNSON. 1967. Enzymatic digestion in the cytochemical demonstration of glycogen. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 14-20.
- SCHARRER B. 1959. The role of neurosecretion in neuro-endocrine integration. In Gorbman, A. (Ed.) *Comparative Endocrinology* Wiley & Sons, New York.
- SCHARRER B. & E. SCHARRER. 1954. Neurosekretion. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen* Vol. 6, pt. 5 Möllendorff, Berlin (Göttingen & Heidelberg).
- SCHARRER E. 1962. Concluding remarks/Neurosecretion. *Mem. soc. Endocr.*, 12, 421-424.
- SCHARRER E. & S. BROWN. 1961. Neurosecretion XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Z. Zellforsch.* 54, 530-540.
- SCHIEBLER T.H. 1958. Darstellung der B-Zellen in Pankreasinseln und von Neurosekret mit Pseudoisocyanin. *Naturwiss* 45, 214.
- SCHOONEVELD H. 1970. Structural aspects of neurosecretory and corpus allatum activity in the adult Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, as a function of daylength. *Neth. J. of Zool.* 20, 151-237. Proefschrift Landbouwhogeschool, Wageningen.
- SCHREINER B. 1966. Histochemistry of the A cell neurosecretory material in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Heteroptera: Lygaeidae), with a discussion of the neurosecretory material, carrier substance problem. *Gen. Comp. Endocrinol.* 6, 388-400.
- SMITH D.S. 1968. *Insect cells. Their Structure and Function*. 372 pp. Oliver and Boyd-Edinburgh.
- SMITH D.S. & J.E. TREHERNE. 1963. Functional aspects of the organization of the insect nervous system. *Advances in Insect Physiology* I. Acad. Press. London & New York.

- SPURR A.R. 1969. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy.
J. Ultrastr. Res. 26, 31-43.
- STEELE J.E. 1961. Occurrence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect.
Nature 192, 681-685.
- STERBA G. 1961 a. Über eine sehr spezifische Methode zum Nachweis von Neurosekret.
Acta biol. med. germ. 7, 228-231.
- STERBA G. 1961 b. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Neurosekretion beim Bachneunauge (Lampetra planeri Bloch).
Z. Zellforsch. 55, 763-789.
- STERBA G. 1964. Grundlagen des histochemischen und biochemischen Nachweises von Neurosekret (= Trägerprotein der Oxytozine) mit Pseudoisozyaninen.
Acta histochem. 17, 268-292.
- STERBA G. & G. HOHEISEL. 1964. Darstellung des neurosekretorischen System der Insekten mit Pseudoisocyanin.
Z. mikrosk. anat. Forsch. 72, 31-48.
- STIENNON J.A. & P. DROCHMANS. 1961. Electron microscope study of neurosecretory cells in Phasmidae.
Gen. comp. Endocrinol 1, 286-294.
- STRAMBI A. 1967. Quelques effets de la castration sur la neurosécrétion protocérébrale des femelles de Polistes (Hyménoptère Vespidae).
C.R. Acad. Sci. Paris 264, 2031-2034.
- STRONG L. 1965. The relationships between the brain, corpora allata, and oöcyte growth in the central american locust, Schistocerca sp. II. The innervation of the corpora allata, the lateral neurosecretory complex, and oöcyte growth.
J. Insect Physiol. 11, 271-280.
- THIERY J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.
J. Microscopie 6, 987-1018.
- THOMSEN E. 1942. An experimental and anatomical study of the corpus allatum in the blow - fly, Calliphora erythrocephala Meig.
Vidensk. Meddr dansk naturh. Foren. 106, 320-405.
- THOMSEN E. 1948. Effect of removal of neurosecretory cells in the brain of adult Calliphora erythrocephala Meig.
Nature (Lond.) 161, 439.
- THOMSEN E. 1952. Functional significance of the neurosecretory brain cells and the corpus cardiacum in the female blow-fly, Calliphora erythrocephala Meig.
J. Exp. Biol. 29, 137-172.
- THOMSEN E. 1954. Studies on the transport of neurosecretory material in Calliphora erythrocephala by means of ligaturing experiments.
J. Exp. Biol. 31, 322-330.

- THOMSEN E. 1956. Observations on the oenocytes of the adult Calliphora erythrocephala Meig.
Bertil Hanström. Zoological papers in honour of his sixty-fifth birthday, Lund 298-306.
- THOMSEN E. & I. MÖLLER. 1959. Neurosecretion and intestinal proteinase activity in an insect, Calliphora erythrocephala Meig.
Nature (Lond.) 183, 1401-1402.
- THOMSEN E. & I. MÖLLER. 1960. Further studies on the function of the neurosecretory brain cells of the adult Calliphora female.
The ontogeny of insects. Acta symposii de evolutione insectorum. Praha 1959.
- THOMSEN E. & I. MÖLLER. 1963. Influence of neurosecretory cells and of corpus allatum on intestinal protease activity in the adult Calliphora erythrocephala Meig.
J. exp. Biol. 40, 301-321.
- THOMSEN E. & M. THOMSEN. 1954. Darkfield microscopy of living neurosecretory cells.
Experientia 10, 206-207.
- THOMSEN M. 1954. Neurosecretion in some Hymenoptera.
Dan. Biol. Skr. 7, 1-34.
- THOMSEN M. 1965. The neurosecretory system of the adult Calliphora erythrocephala. II Histology of the neurosecretory cells of the brain and some related structures.
Z. Zellforsch 67, 693-717.
- THOMSEN M. 1969. The neurosecretory system of the adult Calliphora erythrocephala. IV. A histological study of the corpus cardiacum and its connections with the nervous system.
Z. Zellforsch. 94, 205-219.
- TOMBES A.S. & D. BODENSTEIN. 1967. The neuroendocrine system of the adult alfalfa weevil, Hypera postica.
Am. Zoologist 7, 722.
- TRUMANN J.W. & L.M. RIDDIFORD. 1970. Neuroendocrine control of ecdysis in silkmths.
Science 167, 1624-1626.
- VAN DER KLOOT W.G. 1960. Neurosecretion in insects.
Ann. Rev. Ent. 5, 35-52.
- VAN LAERE O. 1969. Bijdrage tot de Studie van de Endocriene Organen bij de Honingbij (Apis mellifera L.)
Proefschrift : 153 pp. + 41 fig.
- VEREECKE A. & L. HERTVELDT. 1971. Laboratory Rearing of the Cabbage Maggot.
J. Econ. Entomol. 64, 670-673.
- Verslag over de werkzaamheden van het komitee voor de toepassing van isotopen in het landbouwonderzoek (Periode 1 januari 1969 - 31 december 1970). 26 p. I.W.O.N.L. (niet gepubliceerd).

- WATSON M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 475-478.
- WEYER F. 1935. Ueber drüsenartige Nervenzellen im Gehirn der Honigbiene Apis mellifica.
Zool. Anz. 112, 137-141.
- WIGGLESWORTH V.B. 1939. Source of the moulting hormone in Rhodnius.
Nature (Lond.), 144, 753.
- WIGGLESWORTH V.B. 1940. The determination of characters at metamorphosis in Rhodnius prolixus (Hemiptera).
J. Exp. Biol. 17, 201-222.
- WIGGLESWORTH V.B. 1964. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. (J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth, eds.).
Advan. Insect Physiol. 2, 247-336.
- WIGGLESWORTH V.B. 1965. The Principles of Insect Physiology. 6 th edn., Ch. 3 Methuen, London.
- WILLEY R.B. & G.B. CHAPMAN. 1962. Fine Structure of Neurons within the Pars Intercerebralis of the Cockroach, Blaberus craniifer.
Gen. comp. Endocrinol. 2, 31-43.
- WILLIAMS C.M. 1948. The endocrinology of diapause.
Bull. biol. France Belg., Suppl. 33, 52-56.
- WILLIAMS C.M. 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and the prothoracic glands as an endocrine system in the cecropia silkworm.
Biol. Bull. 103, 120-138.
- YOTSUYANAGI Y. & C. GUERRIER. 1965. Mise en évidence par des techniques cytochimiques et la microscopie électronique d'acide désoxyribonucléique dans les mitochondries et les protoplastes d'Allium cepa.
C.R. Acad. Sc., 260, 2344-2347.
- ZIMMERMANN P. 1967 a. Methodische Modifikationen und eine neue Technik zur Darstellung des neurosekretorischen Apparates und der Neuroglia bei Wirbellosen (Lumbricus terrestris L.)
Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie. 68, 154-162.
- ZIMMERMANN P. 1967 b. Fluoreszenzmikroskopische Studien über die Verteilung und Regeneration der Faser glia bei Lumbricus terrestris L.
Z. Zellforsch. 81, 190-220.
- ZIMMERMANN P. 1970. Beziehungen verschiedenartiger Zellkomplexe des normalen und regenerierenden Nervensystems von Lumbricus terrestris L. zum Gefäßsystem.
Z. Zellforsch. 106, 423-438.
- ZOHREN E. 1968. Laboruntersuchungen der Kohlfliege.
Zeitschr. angewandte Entomol. 62, 139-188.

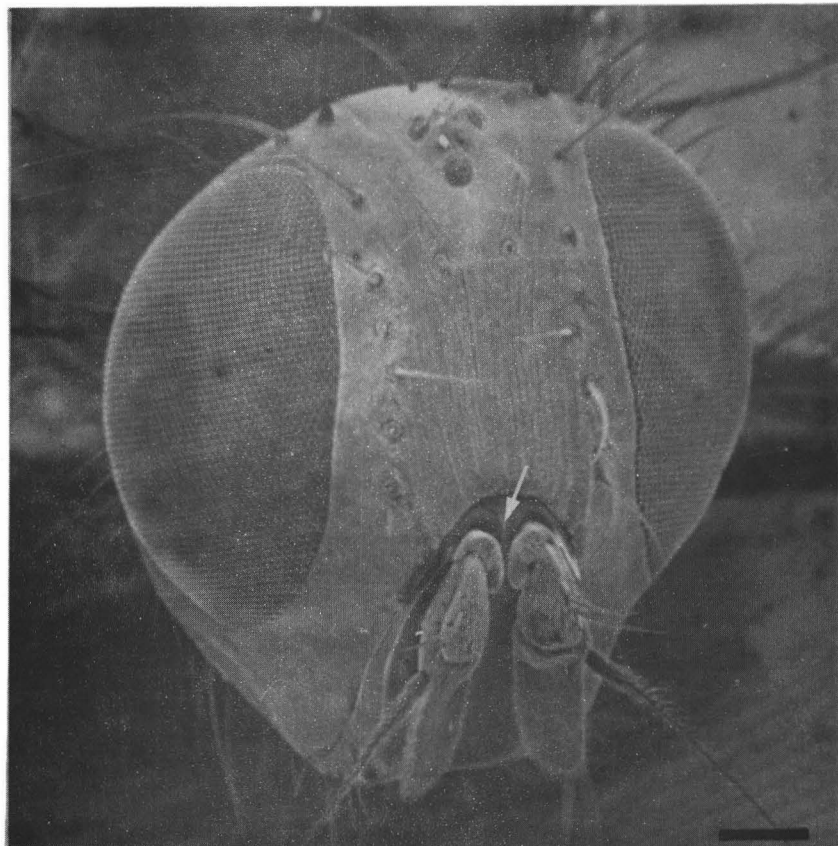
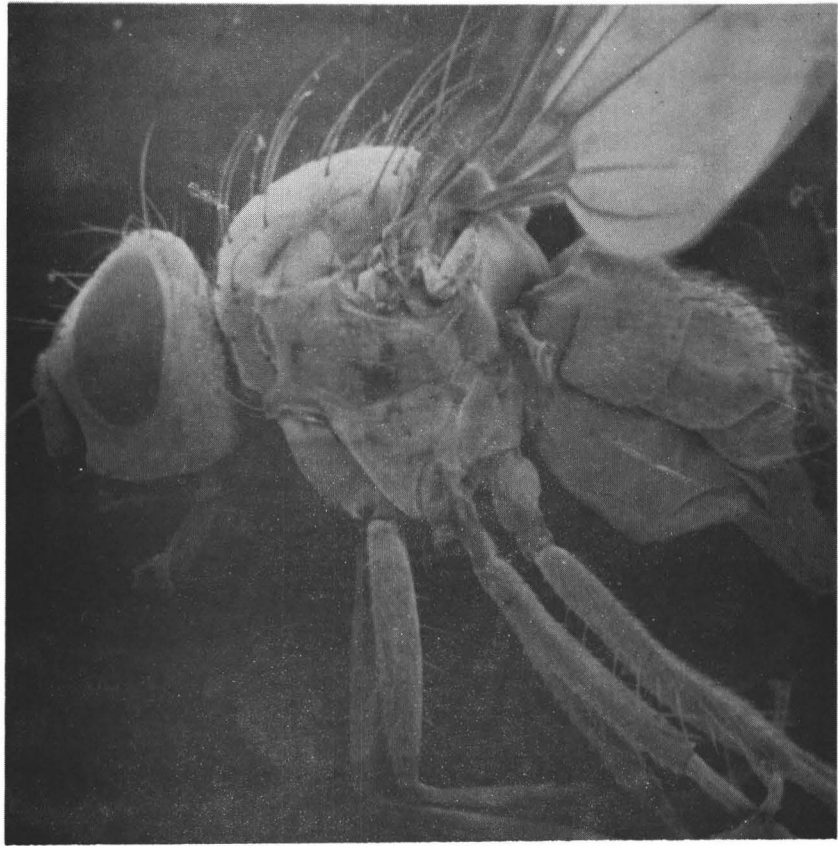
FIGUREN

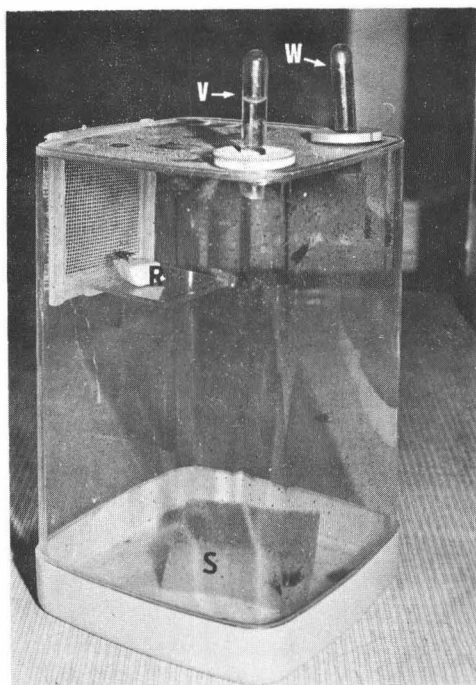
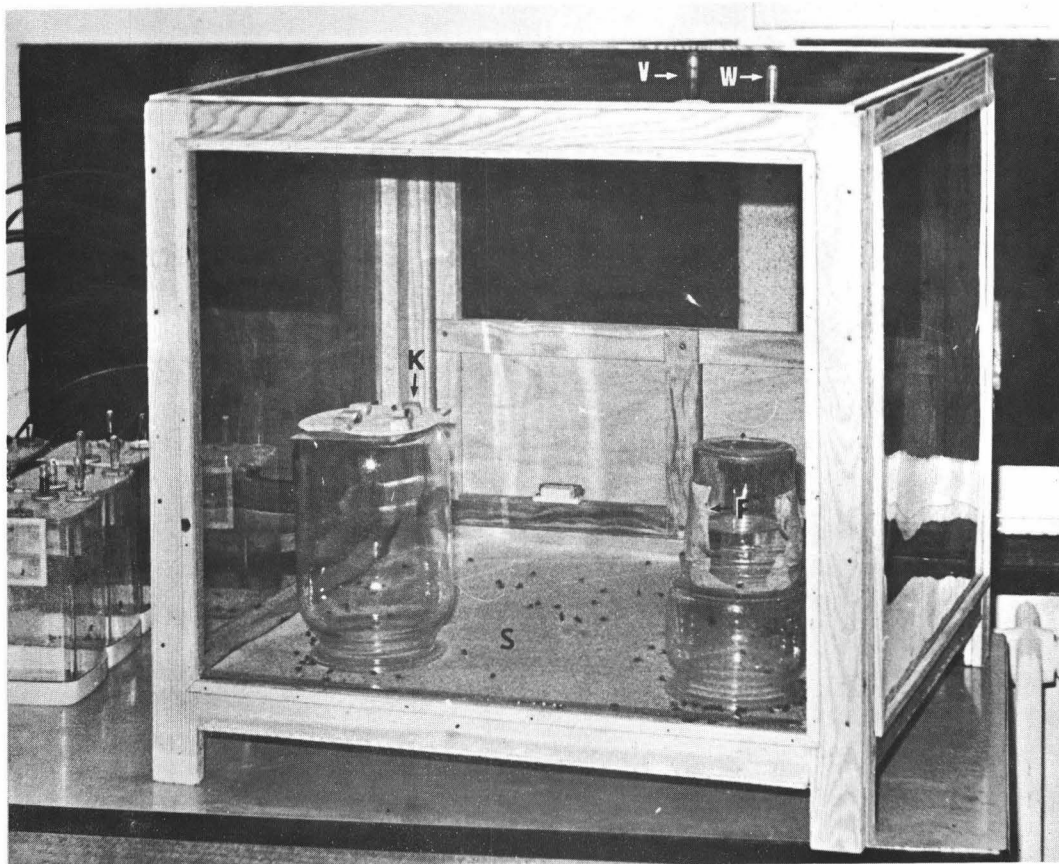
Doctoraat Ir. D. DEGHEELE.

LIJST MET AFKORTINGEN

A : A-cel
A₁ : A₁-cel
B : B-cel
CA : corpus allatum
CC : corpus cardiacum
Ch : chromatine partikels
cm : celmembraan
ER : endoplasmatisch reticulum
g : granulum (a)
Gl : glia cel
Go : Golgi-systeem
H : hersenen
HG : hypocerebraal ganglion
I instulping
Mi : mitochondrie
nm : kernmembraan
No : nucleolus
Np : neuropyleem
nt : neurotubuli
Nu : kern
oe : oesofagus
P : proventriculus
Pi : pars intercerebralis
Ri : ribosoom
T tracheole

pijltjes zonder verwijzing in tekst : kernporie





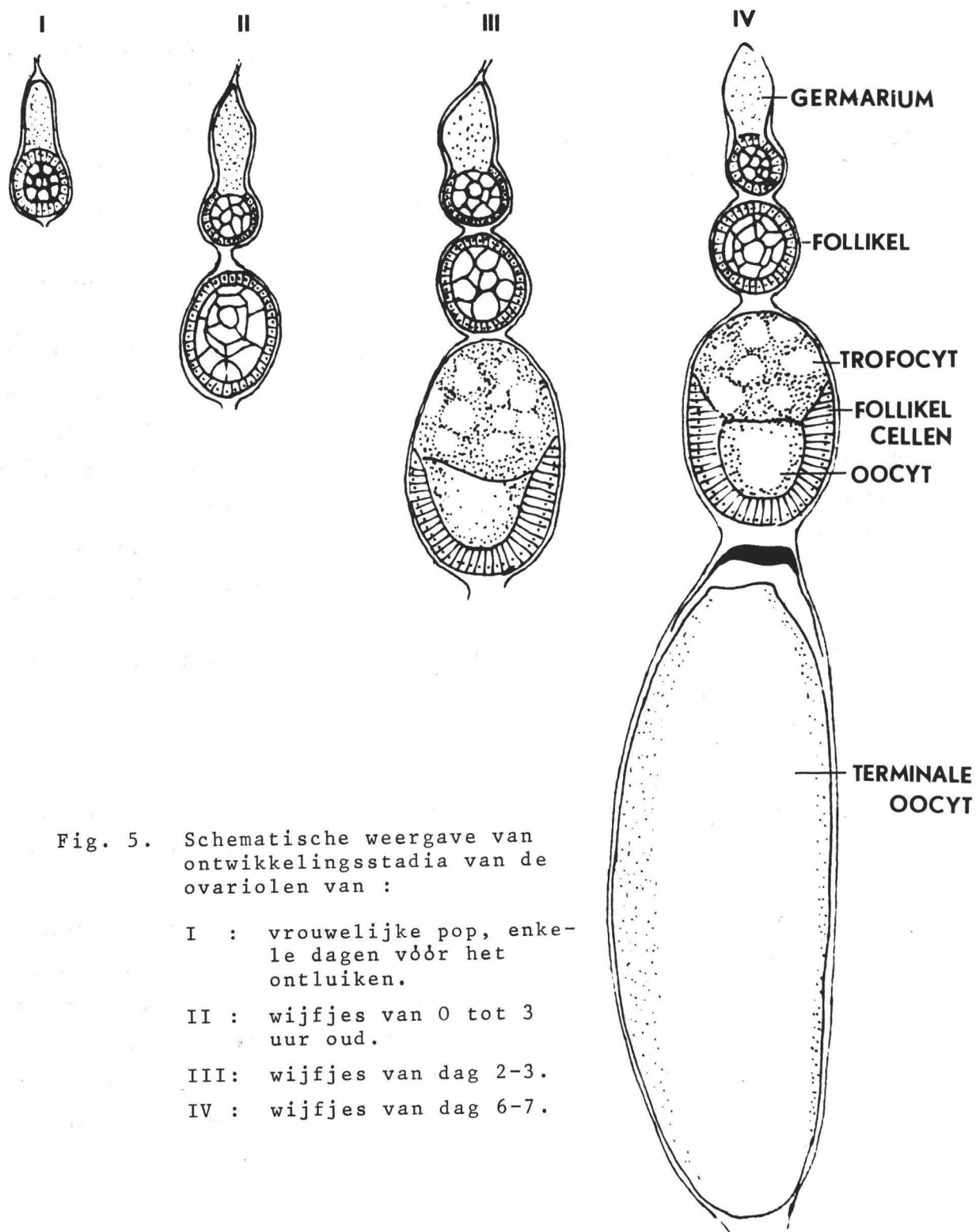
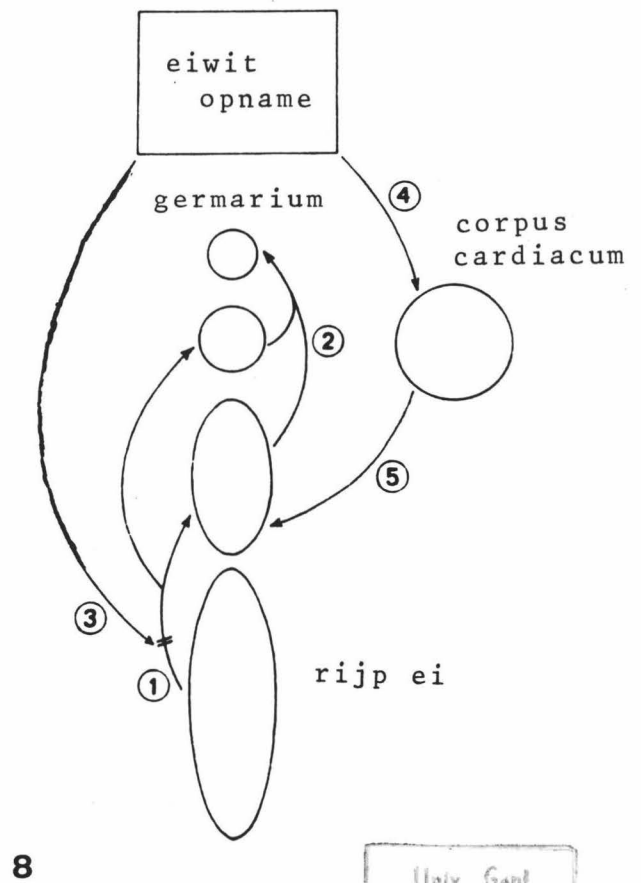
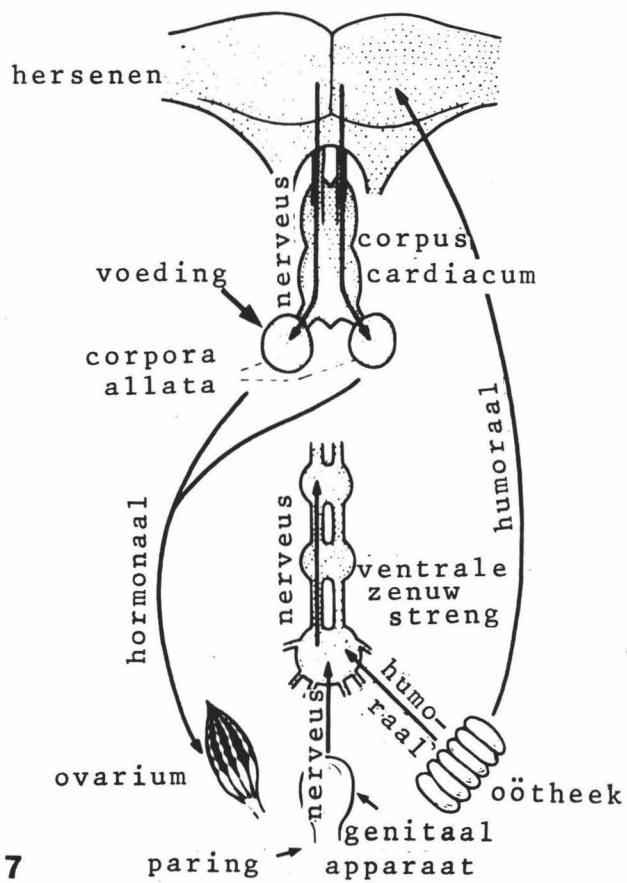
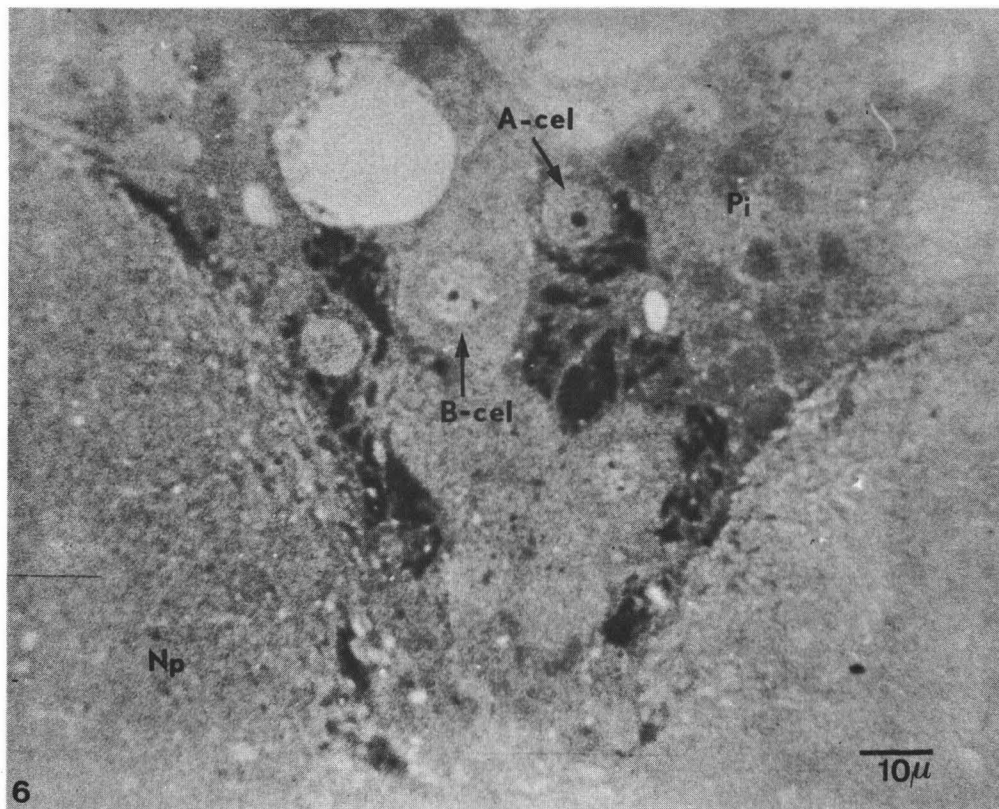


Fig. 5. Schematische weergave van ontwikkelingsstadia van de ovariolen van :

- I : vrouwelijke pop, enkele dagen vóór het ontluiken.
- II : wijffjes van 0 tot 3 uur oud.
- III: wijffjes van dag 2-3.
- IV : wijffjes van dag 6-7.



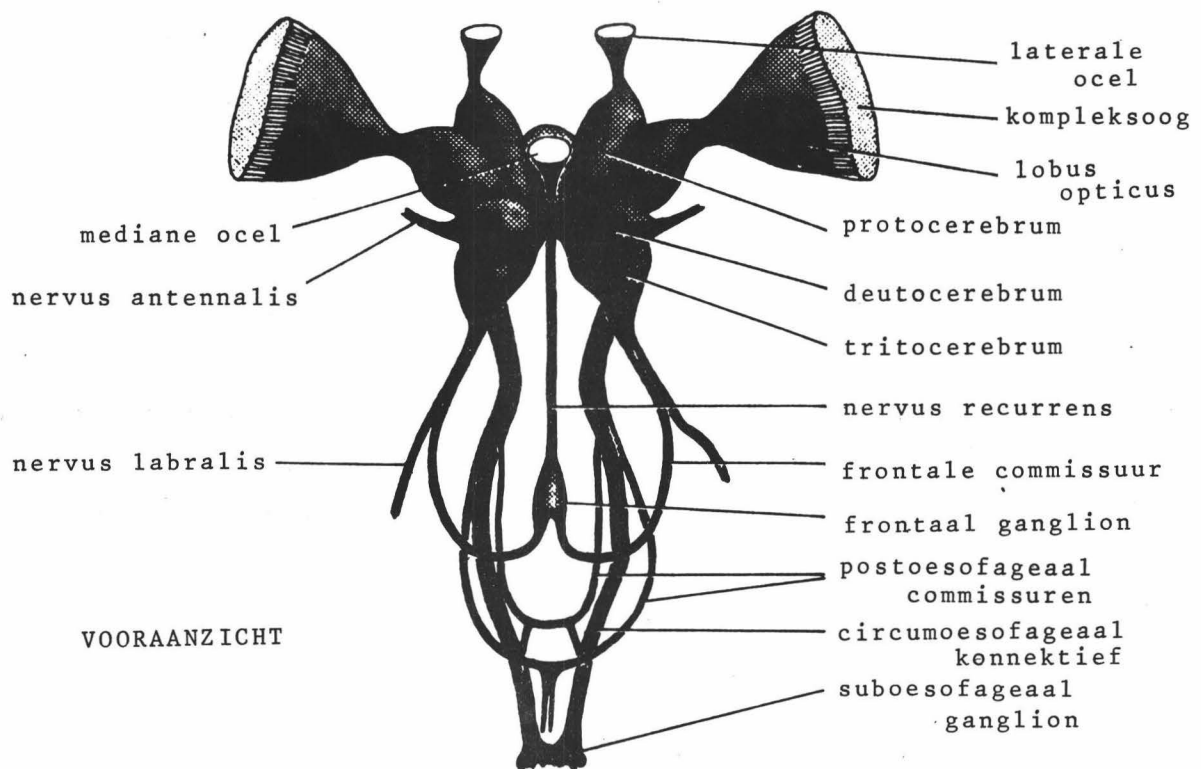


Fig. 9. Voor- en zijaanzicht van de hersenen en het stomatogastrisch zenuwstelsel van de sprinkhaan *Locusta* (Orthoptera) (volgens Albrecht, 1953).

